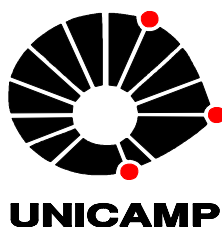


**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**  
**DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS E NUTRIÇÃO**



**EFEITO DA RETICULAÇÃO INDUZIDA PELA TRANSGLUTAMINASE E O  
GLUTARALDEÍDO SOBRE AS PROPRIEDADES DAS MICROPARTÍCULAS  
OBTIDAS POR COACERVAÇÃO COMPLEXA**

Fernando Tello Célis  
Mestrando

Prof. Dr. Carlos Raimundo Ferreira Grosso  
Orientador

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da  
Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre  
em Alimentos e Nutrição

Campinas – SP – Brasil

2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

C33e Célis, Fernando Tello  
Efeito da reticulação induzida pela transglutaminase e o glutaraldeído sobre as propriedades das micropartículas obtidas por coacervação complexa / Fernando Tello Célis. -- Campinas, SP: [s.n.], 2009.

Orientador: Carlos Raimundo Ferreira Grosso  
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Microencapsulação. 2. Coacervação complexa.  
3. Transglutaminase. 4. Glutaraldeído. 5. Liberação controlada.  
I. Grosso, Carlos Raimundo Ferreira. II. Universidade Estadual de  
Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

(cars/fea)

Titulo em inglês: Effect of transglutaminase and glutaraldehyde induced crosslinking on properties of microparticles obtained by complex coacervation.

Palavras-chave em inglês (Keywords): microencapsulation, complex coacervation, transglutaminase, glutaraldehyde, controlled release

Área de concentração: Consumo e Qualidade de Alimentos

Titulação: Mestre em Alimentos e Nutrição

Banca examinadora: Carlos Raimundo Ferreira Grosso

Hélia Harumi Sato

Roberto da Silva

Roney Alexandre Ferreira Rodrigues

Osvaldo de Freitas

Data da defesa: 20/02/2009

Programa de Pós Graduação: Programa em Alimentos e Nutrição

## **BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Carlos Raimundo Ferreira Grosso  
Universidade Estadual de Campinas  
Orientador

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Hélia Harumi Sato  
Universidade Estadual de Campinas  
Membro

---

Prof. Dr. Roberto da Silva  
IBELCE – UNESP  
Membro

---

Dr. Roney Alexandre Ferreira Rodrigues  
CPQBA - Unicamp  
Suplente

---

Prof. Dr. Osvaldo de Freitas  
FCF – USP – R. PRETO  
Suplente

---

*“Tudo quanto te vier à mão para fazer, faze-o  
conforme as tuas forças, porque na sepultura, para onde tu vais,  
não há obra nem projeto, nem conhecimento, nem sabedoria alguma”  
Eclesiastes: 9:10*



*Dedico este trabalho a meus pais Luz Leonor e Segundo  
pelo amor e incentivo constantes, por todos os ensinamentos e  
momentos de felicidade compartilhados nesta vida.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pela minha vida, pelas pessoas e oportunidades abençoadas que sempre colocou em meu caminho.

Agradeço...

À UNICAMP, em especial à Faculdade de Engenharia de Alimentos e ao departamento de Alimentos e Nutrição pela acolhida e pela estrutura oferecida para o desenvolvimento do trabalho.

Ao Prof. Dr. Carlos Grosso, orientador desta dissertação, pela sua confiança, disponibilidade, pela disciplina e respeito ao nosso trabalho. Meus irrestritos agradecimentos pela oportunidade desde o começo e durante todo o tempo na UNICAMP.

Aos membros da banca examinadora, pelo tempo dedicado na avaliação deste trabalho e pelas valiosas correções, que enriqueceram a redação final da dissertação.

A Yara, pelo valioso suporte durante as diferentes etapas deste trabalho. E pela paciência!!!

Aos funcionários do Departamento de Alimentos e Nutrição ao Francisco, Eliana, Fátima, Susana, pela atenção brindada.

As pessoas que contribuíram para que as microscopias pudessem ser realizadas: Prof. Aureo Yamada e sua equipe.

Ao Dr. Rodney e Dr. Adilson de CPQBA, pela ajuda em os análises cromatográficos.

A todas as meninas do laboratório: Noemi, Andréa, Caroline, Glaucia, Camila, Alda, Luciana, Bárbara e Veronique que tornaram minha permanência mais agradável.

A todos agradeço, profundamente. *MUITO OBRIGADO!*

## ÍNDICE GERAL

Índice geral.....	vii
Índice de figuras.....	xii
Índice de tabelas.....	xv
Abreviaturas.....	xvii
Resumo.....	xix
Abstrac.....	xxi
<b>1. Introdução.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Revisão bibliográfica.....</b>	<b>5</b>
2.1 Microencapsulação.....	5
2.2 Aplicação da microencapsulação na indústria de alimentos.....	7
2.3 Microencapsulação por coacervação complexa.....	10
2.3.1 Parâmetros físico-químicos.....	12
2.3.1.1 Tipos de forças químicas.....	12
2.3.1.2 pH.....	13
2.3.1.3 Massa molar.....	13
2.3.1.4 Razão específica dos biopolímeros no sistema de coacervação complexa.....	14
2.3.2 Parâmetros físicos do processo de coacervação complexa.....	14
2.3.2.1 Efeito da temperatura na coacervação complexa.....	15
2.3.2.2 Efeito da agitação e pressão na coacervação complexa .....	15
2.4 Materiais de parede para coacervação complexa.....	15
2.4.1 Goma arábica.....	16
2.4.2 Gelatina.....	18

2.5 Material de recheio.....	20
2.5.1 Páprica.....	20
2.5.2 Timol.....	22
2.6 Propriedades de parede - Agentes reticulantes.....	23
2.6.1 Transglutaminase.....	24
2.6.2 Glutaraldeído.....	28
2.7 Liberação do material de recheio.....	30
<b>3. Objetivos.....</b>	<b>34</b>
3.1 Objetivo geral.....	34
3.2 Objetivos específicos.....	34
<b>4. Material e métodos.....</b>	<b>36</b>
4.1 Material.....	36
4.2 Equipamentos.....	36
4.3 Métodos.....	37
4.3.1 Caracterização química parcial da gelatina e goma arábica.....	37
4.3.1.1 Determinação de umidade.....	37
4.3.1.2 Determinação de proteína.....	37
4.3.2 Produção das micropartículas por coacervação complexa.....	37
4.3.3 Reação de reticulação.....	38
4.3.3.1 Reticulação química com glutaraldeído.....	38
4.3.3.2 Reticulação enzimática com transglutaminase.....	38
4.3.4 Secagem das micropartículas.....	39
4.3.5 Caracterização das micropartículas coacervadas.....	39
4.3.5.1 Determinação de umidade.....	39

4.3.5.2 Determinação de proteína.....	40
4.3.5.3 Determinação do diâmetro médio e distribuição de tamanho das micropartículas.....	40
4.3.5.4 Microscopia óptica e eletrônica de varredura.....	40
4.3.6 Resistência das micropartículas coacervadas a diversos tratamentos.....	41
4.3.6.1 Inchamento das micropartículas em água após secagem por liofilização..	41
4.3.6.2 Resistência das micropartículas em soluções contendo dodecil sulfato de sódio (2% e 5%).....	41
4.3.6.3 Avaliação da resistência das micropartículas a diferentes temperaturas por microscopia ótica.....	42
4.3.6.4 Resistência das micropartículas as diferentes condições de pH.....	42
4.3.6.5 Resistência das micropartículas à ação das enzimas digestivas (pepsina e pancreatina).....	42
4.3.7 Estudo da eficiência da reticulação.....	43
4.3.7.1 Liberação do material de recheio contendo timol.....	43
4.3.7.2 Liberação de oleoresina de páprica de micropartículas coacervadas em óleo de girassol.....	45
4.3.7.3 Efeito da reticulação em condições gástricas (pH ácido, pepsina) na liberação da oleoresina de páprica.....	46
4.3.8 Análise estatística.....	46
<b>5. Resultados e discussão.....</b>	<b>47</b>
5.1 Caracterização das micropartículas coacervadas.....	47
5.2 Determinação de diâmetro médio das micropartículas coacervadas.....	51
5.3 Morfologia e microestrutura das micropartículas coacervadas úmidas e liofilizadas .....	56
5.4 Resistência das micropartículas coacervadas a diversos tratamentos.....	61

5.4.1 Inchamento das micropartículas em água após secagem por liofilização.....	62
5.4.2 Resistência das micropartículas em soluções contendo dodecil sulfato de sódio (2% e 5%).....	65
5.4.3 Avaliação da resistência das micropartículas a diferentes temperaturas por microscopia ótica.....	71
5.4.4 Resistência das micropartículas as diferentes condições de pH.....	75
5.4.5 Resistência das micropartículas à ação das enzimas digestivas (pepsina e pancreatina).....	81
5.5 Estudo da eficiência da reticulação .....	85
5.5.1 Eficiência de encapsulação.....	89
5.5.2 Liberação de oleoresina de páprica de micropartículas coacervadas em óleo de girassol.....	90
5.5.3 Efeito da reticulação e do tratamento das micropartículas em condições gástricas (pH ácido, pepsina) na liberação da oleoresina de páprica.....	94
<b>6. Conclusões.....</b>	<b>97</b>
<b>7. Referências bibliográficas.....</b>	<b>99</b>
<b>8. Anexos.....</b>	<b>119</b>
8.1 Anexo 1 – Liberação de timol das micropartículas coacervadas em solução aquosa de SDS 1%.....	119
8.2 Anexo 2 – Fotos da liberação de timol das micropartículas coacervadas da emulsão goma arábica/oleoresina de páprica-óleo de soja, em solução aquosa de SDS 1%.....	120
8.3 Anexo 3 – Curva padrão de oleoresina de páprica, em óleo de girassol.....	122
8.4 Anexo 4 - Espectro de varredura para oleoresina de páprica solubilizada em óleo de girassol (concentração de 0,15mg de oleoresina de páprica/mL de óleo de girassol).....	123

8.5 Anexo 5 – Perfis de liberação de oleoresina de páprica contida em micropartículas coacervadas da emulsão gelatina/oleoresina de páprica-óleo de soja, em óleo de girassol .....	124
8.6 Anexo 6 – Perfis de liberação de oleoresina de páprica contida em micropartículas coacervadas da emulsão goma arábica/oleoresina de páprica-óleo de soja, em óleo de girassol.....	125
8.7 Anexo 7 – Porcentagem de liberação de oleoresina de páprica contida nas micropartículas coacervadas em condições gástricas, em óleo de girassol.....	126

**ÍNDICE DE FIGURAS**

Figura 2.1. Goma arábica: <i>Acácia tortilis</i> , <i>In natura</i> e processada ( <i>spray dryer</i> )....	16
Figura 2.2. Estrutura molecular da goma arábica.....	18
Figura 2.3. Estrutura química da gelatina.....	19
Figura 2.4. Reações catalisadas pela TG.....	26
Figura 2.5. Reação de reticulação de proteínas utilizando-se glutaraldeído.....	28
Figura 2.6. Distribuição do recheio.....	33
Figura 4.1. Sistema de liberação elaborado para o estudo com micropartículas contendo timol.....	44
Figura 5.1. Imagens obtidas por microscopia ótica (coluna 2) e por microscopia eletrônica de varredura (coluna 3) de micropartículas coacervadas úmidas e liofilizadas: sem reticulação e reticuladas com diferentes concentrações de transglutaminase (10, 20, 30, 40 e 50U/g.ptn) e reticuladas com glutaraldeído (1mM/g.ptn).....	57
Figura 5.2. Imagens obtidas por microscopia ótica (coluna 2) e por microscopia eletrônica de varredura (coluna 3) de micropartículas coacervadas úmidas e liofilizadas: sem reticulação e reticuladas com diferentes concentrações de transglutaminase (10, 20, 30, 40 e 50U/g.ptn) e reticuladas com glutaraldeído (1,0mM/g de proteína).....	59
Figura 5.3. Imagens das micropartículas coacervadas úmidas da emulsão gelatina/oleoresina de páprica-óleo de soja após 1h de suspensão em solução de SDS (2% e 5%) obtidas por microscopia ótica.....	67
Figura 5.4. Imagens das micropartículas coacervadas úmidas da emulsão goma arábica/oleoresina de páprica-óleo de soja após 1h de suspensão em solução de SDS (2% e 5%) obtidas por microscopia ótica.....	69



Figura 5.5. Imagens das micropartículas coacervadas úmidas da emulsão gelatina/oleoresina de páprica-óleo de soja após 15 min de incubação em água a 65°C (coluna 2) e 97°C (coluna 3), obtidas por microscopia ótica.....	72
Figura 5.6. Imagens das micropartículas coacervadas úmidas da emulsão goma arábica/oleoresina de páprica-óleo de soja após 15 min de incubação em água a 65° (coluna 2) e 97°C (coluna 3), obtidas por microscopia ótica.....	73
Figura 5.7. Imagens das micropartículas coacervadas liofilizadas da emulsão gelatina/oleoresina de páprica-óleo de soja após 1h de incubação em solução aquosa pH 1 (coluna 2) e pH 2 (coluna 3), obtidas por microscopia ótica.....	76
Figura 5.8. Imagens das micropartículas coacervadas liofilizadas da emulsão goma arábica/oleoresina de páprica-óleo de soja após 1h de incubação em solução aquosa pH 1 (coluna 2) e pH 2 (coluna 3), obtidas por microscopia ótica.....	78
Figura 5.9. Imagens das micropartículas coacervadas liofilizadas após 1h de incubação em solução aquosa pH 7 (coluna 2: emulsão gelatina/oleoresina de páprica-óleo de soja e coluna 3: emulsão goma arábica:oleoresina de páprica-óleo de soja), obtidas por microscopia ótica.....	80
Figura 5.10. Imagens das micropartículas coacervadas liofilizadas da emulsão gelatina/oleoresina de páprica-óleo de soja após 2h de incubação em solução pepsina (2,65U/mg de ptn) e 4h de incubação em solução de pancreatina (0,15mg/mL), obtidas por microscopia ótica.....	82
Figura 5.11. Imagens das micropartículas coacervadas liofilizadas da emulsão goma arábica/oleoresina de páprica-óleo de soja após 2h de incubação em solução pepsina (2,65U/mg de ptn) e 4h de incubação em solução de pancreatina (0,15mg/mL), obtidas por microscopia ótica.....	83
Figura 8.1: Fotos de liberação de timol das micropartículas coacervadas da emulsão goma arábica/oleoresina de páprica-óleo de soja em solução aquosa de SDS 1%.....	120
Figura 8.2: Curva padrão de oleoresina de páprica, em óleo de girassol.....	122

Figura 8.3: Perfis de liberação de oleoresina de páprica contida em micropartículas coacervadas da emulsão gelatina/oleoresina de páprica-óleo de soja, em óleo de girassol.....	124
Figura 8.4: Perfis de liberação de oleoresina de páprica contida em micropartículas coacervadas da emulsão goma arábica/oleoresina de páprica-óleo de soja, em óleo de girassol.....	125
Figura 8.5. Porcentagem de liberação de oleoresina de páprica contida nas micropartículas coacervadas em condições gástricas, em óleo de girassol.....	126

## **ÍNDICE DE TABELAS**

Tabela 2.1. Ingredientes alimentícios que são encapsulados.....	8
Tabela 2.2. Agentes encapsulantes e seus prováveis mecanismos de liberação..	32
Tabela 5.1. Condições de reticulação química e enzimática de micropartículas coacervadas contendo como recheio oleoresina de páprica-óleo de soja.....	47
Tabela 5.2. Diâmetros médios ( $\mu\text{m}$ ), respectivos desvios padrões e distribuição de tamanho das micropartículas coacervadas úmidas da emulsão gelatina/oleoresina de páprica óleo de soja.....	52
Tabela 5.3. Diâmetros médios ( $\mu\text{m}$ ), respectivos desvios padrões e distribuição de tamanho das micropartículas coacervadas úmidas da emulsão goma arábica/oleoresina de páprica-óleo de soja. ....	54
Tabela 5.4. Diâmetros médios ( $\mu\text{m}$ ), desvios padrões das micropartículas liofilizadas e re-hidratadas da emulsão gelatina/oleoresina de páprica-óleo de soja.....	63
Tabela 5.5. Diâmetros médios ( $\mu\text{m}$ ), desvios padrões das micropartículas liofilizadas e re-hidratadas da emulsão goma arábica/oleoresina de páprica-óleo de soja.....	64
Tabela 5.6. Diâmetros médios ( $\mu\text{m}$ ), respectivos desvios padrões das micropartículas coacervadas úmidas da emulsão gelatina/oleoresina de páprica-óleo de soja após 1h de suspensão em solução de SDS (2% e 5%).....	67
Tabela 5.7. Diâmetros médios ( $\mu\text{m}$ ), respectivos desvios padrões das micropartículas coacervadas úmidas da emulsão goma arábica/oleoresina de páprica-óleo de soja após 1h de suspensão em solução de SDS (2% e 5%).....	69
Tabela 5.8. Eficiência de encapsulação (%EE), desvios padrões das micropartículas coacervadas e liofilizadas.....	89

Tabela 5.9. Porcentagem de oleoresina de páprica liberada ao longo do tempo das micropartículas coacervadas, liofilizadas, reticuladas com transglutaminase (10-50U/g.ptn), glutaraldeído (1mM/g.ptn) e sem reticulação da emulsão gelatina/oleoresina de páprica-óleo de soja, em óleo de girassol.....93

Tabela 5.10. Porcentagem de oleoresina de páprica liberada ao longo do tempo das micropartículas coacervadas, liofilizadas, reticuladas com transglutaminase (10-50U/g.ptn), glutaraldeído (1mM/g.ptn) e sem reticulação da emulsão goma arábica/oleoresina de páprica-óleo de soja, em óleo de girassol.....94

Tabela 5.11. Porcentagem de oleoresina de páprica liberada em condições gástricas das micropartículas coacervadas sem reticulação, reticuladas com transglutaminase (50U/g.ptn) e micropartículas reticuladas com glutaraldeído (1mM/g.ptn), dos dois sistemas, em óleo de girassol.....95

## ABREVIATURAS

%EE: Eficiência de encapsulação.

/g.ptn: “por grama de proteína”.

GA: Goma arábica.

GE: Gelatina.

GAMSR: Micropartículas sem reticulação da emulsão goma arábica/oleoresina de páprica-óleo de soja.

GAMR10U: Micropartículas reticuladas com transglutaminase (10U/g.ptn) da emulsão goma arábica/oleoresina de páprica-óleo de soja.

GAMR20U: Micropartículas reticuladas com transglutaminase (20U/g.ptn) da emulsão goma arábica/oleoresina de páprica-óleo de soja.

GAMR30U: Micropartículas reticuladas com transglutaminase (30U/g.ptn) da emulsão goma arábica/oleoresina de páprica-óleo de soja.

GAMR40U: Micropartículas reticuladas com transglutaminase (40U/g.ptn) da emulsão goma arábica/oleoresina de páprica-óleo de soja.

GAMR50U: Micropartículas reticuladas com transglutaminase (50U/g.ptn) da emulsão goma arábica/oleoresina de páprica-óleo de soja.

GAGLU: Micropartículas reticuladas com glutaraldeído (1 mM/g.ptn) da emulsão goma arábica/oleoresina de páprica-óleo de soja.

GEMSR: Micropartículas sem reticulação da emulsão gelatina/oleoresina de páprica-óleo de soja.

GEMR10U: Micropartículas reticuladas com transglutaminase (10U/g.ptn) da emulsão gelatina/oleoresina de páprica-óleo de soja.

GEMR20U: Micropartículas reticuladas com transglutaminase (20U/g.ptn) da emulsão gelatina/oleoresina de páprica-óleo de soja.

GEMR30U: Micropartículas reticuladas com transglutaminase (30U/g.ptn) da emulsão gelatina/oleoresina de páprica-óleo de soja.

GEMR40U: Micropartículas reticuladas com transglutaminase (40U/g.ptn) da emulsão gelatina/oleoresina de páprica-óleo de soja.

GEMR50U: Micropartículas reticuladas com transglutaminase (50U/g.ptn) da emulsão gelatina/oleoresina de páprica-óleo de soja.

GEGLU: Micropartículas reticuladas com glutaraldeído (1 mM/g.ptn) da emulsão gelatina/oleoresina de páprica-óleo de soja.

MSR: Micropartículas sem reticulação.

MR10U: Micropartículas reticuladas com transglutaminase (10U/g.ptn).

MR20U: Micropartículas reticuladas com transglutaminase (20U/g.ptn).

MR30U: Micropartículas reticuladas com transglutaminase (30U/g.ptn).

MR40U: Micropartículas reticuladas com transglutaminase (40U/g.ptn).

MR50U: Micropartículas reticuladas com transglutaminase (50U/g.ptn).

GLU: Micropartículas reticuladas com glutaraldeído (1mM/g.ptn).

pI: Ponto isoelétrico.

SDS: Dodecil sulfato de sódio.

## **RESUMO**

Micropartículas foram produzidas por coacervação complexa utilizando gelatina e goma arábica como materiais formadores de parede e uma mistura de oleoresina de páprica-óleo de soja (1:10) em quantidade que corresponde a 50% de massa dos materiais de parede. A ordem de produção das emulsões, gelatina/oleoresina de páprica-óleo de soja ou goma arábica/oleoresina de páprica-óleo de soja, a reticulação das micropartículas com transglutaminase (10 a 50U/g.ptn) ou com glutaraldeído (1mM/g.ptn) e a melhora de características funcionais em função desses fatores foram avaliadas. Foram avaliadas a capacidade de inchamento, resistência à solução de dodecil sulfato de sódio (SDS, 2 e 5%), à temperatura (65 e 97°C/15 min), valores de pH 1, 2 e 7 e resistência a condições simuladas do pH do estômago e intestino (temperatura e enzimas). Adicionalmente foi acompanhado o efeito dos tratamentos na liberação do recheio hidrofóbico em óleo de girassol. Microscopia ótica, eletrônica de varredura e espectrofotometria foram utilizadas para as avaliações de resistência e de liberação. As micropartículas apresentaram forma esférica e tamanho médio na faixa de 55-70µm, com o recheio distribuído de forma multinuclear e homogênea. As micropartículas resistiram, mantendo-se íntegras, nas temperaturas testadas, às soluções de SDS, às condições drásticas de pH ácido simulando o suco gástrico (pH, pepsina e temperatura) especialmente aquelas tratadas com transglutaminase a partir de 20U/g.ptn enquanto as não reticuladas se desfizeram. Todas as micropartículas produzidas se desfizeram nas condições simuladas do intestino (pH, pancreatina e temperatura). A liberação de oleoresina de páprica-óleo de soja em óleo de girassol foi inversamente proporcional a quantidade de agente reticulante utilizado. O aumento do reticulante diminuiu a quantidade liberada do composto de cor. Melhores resultados de liberação foram obtidos para micropartículas produzidas com a emulsão goma arábica/oleoresina de páprica-óleo de soja. As avaliações da liberação da oleoresina de páprica-óleo de soja após submeter às micropartículas às condições entéricas ácido-enzima mostraram que micropartículas sem reticulação liberaram em torno de 55% da

oleoresina de páprica-óleo de soja encapsulada enquanto para micropartículas reticuladas com transglutaminase a 50U/g.ptn liberaram em torno de 33% da oleoresina de páprica-óleo de soja encapsulada. Melhor retenção foi observada para micropartículas reticuladas com glutaraldeído que liberaram em torno de 11% da oleoresina de páprica-óleo de soja encapsulada. No teste gástrico a ordem de preparação da emulsão não apresentou diferenças na quantidade liberada após a incubação em meio fortemente ácido contendo pepsina.

Palavras-chave: microencapsulação, coacervação complexa, transglutaminase, glutaraldeído, liberação controlada.



## **ABSTRACT**

Microparticles were produced by complex coacervation using gelatin and gum Arabic as wall forming materials and a mixture of paprika oleoresin-soy oil (1:10) in a quantity that correspond to 50% of wall material mass. The emulsions production order, gelatin/ paprika oleoresin-soy oil or gum Arabic/paprika oleoresin:soy oil, the crosslinking of the microparticles with transglutaminase (10 to 50 U/g.ptn) or with glutaraldehyde (1mM/g.ptn) and the improvement of functional characteristics as a function of these factors were evaluated. Swelling capacity, resistance to sodium dodecyl sulfate solution (SDS, 2 and 5%), to temperature (65 and 97°C/15 min), to pH values 1, 2 and 7 and the resistance to simulated stomach and intestine pH (temperature and enzymes) were evaluated. Additionally, the effect of treatments on the release of hydrophobic core in sunflower oil was measured. Optic and scanning electronic microscopy and spectrophotometry were used to the resistance and release evaluations. The microparticles showed spherical shape and mean diameter from 55 to 70  $\mu\text{m}$ , with the core distribution multinuclear and homogeneous. The microparticles remained intact in the temperatures tested, in SDS solutions, in drastic conditions of acid pH simulating the gastric juice (pH, pepsin, and temperature) specially the ones treated with transglutaminase concentration at least 20 U/g.ptn while the ones not crosslinked were broken. All the microparticles were solubilized in the simulated intestine conditions (pH, pancreatin, and temperature). The release of paprika oleoresin-soy oil in sunflower oil was inversely proportional to crosslinking agent quantity used. The increasing of crosslinking agent decreased the release of color compound quantity. The best results of release were obtained for microparticles produced with an emulsion gum Arabic/paprika oleoresin-soy oil. In acid-enzyme enteric conditions, the microparticles without crosslinking released around 55% of encapsulated paprika oleoresin-soy oil while crosslinked microparticles with transglutaminase at 50U/g.ptn released around 33% of initially encapsulated paprika oleoresin-soy oil. The best retention was observed for microparticles crosslinked with glutaraldehyde that released around 11% of encapsulated paprika

oleoresin-soy oil. In the gastric test, the emulsion preparation order not showed differences in the released quantity after incubation in the strong acid environment containing pepsin.

Keywords: microencapsulation, complex coacervation, transglutaminase, glutaraldehyde, controlled release.

## **1. INTRODUÇÃO**

A microencapsulação é um processo de recobrimento de materiais que podem ser sólidos, líquidos ou gasosos com a finalidade de protegê-los contra condições adversas do meio, incluindo pH, ação de enzimas proteolíticas, oxigênio e luz entre outros (ANDRES, 1977).

Uma segunda propriedade da microencapsulação é a possibilidade de produzir a liberação controlada do material de recheio encapsulado no local e na forma desejada para se obter vantagens funcionais deste mecanismo (SPARKS, 1981).

Diferentes métodos de obtenção são possíveis, produzindo partículas com diferentes propriedades incluindo partículas solúveis ou insolúveis em água, característica, extremamente importante em aplicações alimentícias. Além da utilização em alimentos, muitas aplicações foram e continuam sendo desenvolvidas nos segmentos farmacêutico, químico e cosmético entre outros (KRUIF *et al.*, 2004).

Entre os métodos de produção de micropartículas a coacervação complexa foi primeiro descrito por Bungerberg de Jong (1949), como um processo espontâneo de separação de fases que ocorre quando polieletrólitos carregados com cargas opostas são misturados em proporções estequiométricas envolvendo basicamente interações eletrostáticas (VANDERGAER, 1974). O termo é oriundo do latim "co" e "acervus" significando união e agregação de partículas (TOLSTOGUZOV, 2003).

A complexação resulta da aproximação de regiões das cadeias poliméricas (em geral uma proteína e um polissacarídeo aniônico) contendo cargas opostas podendo ocorrer duas situações dependendo do balanço entre cargas positivas e negativas; quando não são iguais é possível formar complexos solúveis pela interação das cargas remanescentes com a água e quando se apresentam nas mesmas quantidades o complexo formado com carga próxima a neutralidade se torna insolúvel (SCHMITT, 1998).

Especificamente o sistema gelatina-goma arábica tem sido largamente empregado para a produção de microencapsulação por coacervação complexa e muitas aplicações são descritas na literatura incluindo entre outros o papel carbono sem cor e a encapsulação de agentes flavorizantes (VERSIC, 1988).

O fenômeno ocorre sobre condições específicas e depende principalmente das cargas e da densidade de carga dos polímeros, da tensão superficial do sistema, da temperatura na qual o sistema é mantido, das condições de agitação e resfriamento do sistema e da força iônica onde o sistema se encontra (TURGEOSU *et al.*, 2003). Este tipo de processo é favorecido para a encapsulação de compostos hidrofóbicos (XING *et al.*, 2004). Apresenta ainda como vantagens comparadas aos outros tipos de produção, uma grande capacidade de encapsulação de recheios hidrofóbicos, excedendo bastante em massa a quantidade de material de parede utilizado (THIES, 1995).

As micropartículas produzidas por coacervação complexa apesar da vantagem de encapsularem grandes quantidades de recheio apresentam baixa resistência mecânica e térmica devido à natureza iônica das interações entre os polímeros formadores sendo necessário produzir um fortalecimento da parede através de reticulação em geral envolvendo a proteína, que pode ser feito utilizando-se reticulantes químicos ou enzimáticos (BURGESS & PONSART, 1998). Propriedades de liberação/retenção podem também ser alterados pelo aumento de reticulação da parede das partículas (LAMPRECHT *et al.*, 2000).

Aldeídos como glutaraldeído e formaldeído são geralmente utilizados produzindo ligações irreversíveis e resistentes às condições extremas de pH e temperatura (HERNANDEZ-MUÑOZ *et al.*, 2004). No entanto a toxicidade de aldeídos tem limitado a exploração de seu uso para produzir reticulação em sistemas contendo proteínas em produtos alimentícios ou aplicações farmacêuticas (GALLIETA, 1998).

A introdução de ligações cruzadas na proteína por via enzimática utilizando a transglutaminase pode ser uma alternativa para melhor estruturação da matriz que se constitui na parede da micropartícula (BABIN & DICKSON,

2001). A transglutaminase é uma enzima capaz de promover a reticulação entre proteínas pela catálise de reações de acil-transferência entre grupos carboxiamídicos e resíduos de glutamina da cadeia polipeptídica com aminas primárias, incluindo os grupos  $\epsilon$ -amino de resíduos de lisina, resultando na formação de ligações  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamil)lisina intra e intermoleculares (MOTOKI & SEGURO, 1998). Além da possibilidade de uso em alimentos a enzima é aquosolúvel e pode ser removida do sistema após reticulação.

Recentemente micropartículas produzidas por coacervação complexa foram reticuladas com glutaraldeído e com transglutaminase e o efeito da reticulação foi avaliado com relação às propriedades de liberação de um composto fluorescente hidrofóbico utilizado como material de recheio em meios contendo surfactantes (PRATA *et al.*, 2008). Os autores observaram maior efeito na reticulação sobre o controle da liberação do composto fluorescente produzido pelo glutaraldeído em relação a transglutaminase, embora os dois agentes reticulantes tenham efetivamente produzido a reticulação conforme observado pela solubilização das micropartículas não reticuladas em meio aquoso contendo dodecil sulfato de sódio.

Em outro trabalho recente, Alvim (2005) observou que somente micropartículas obtidas por coacervação complexa e reticuladas com glutaraldeído ou transglutaminase puderam ser secas por *spray dryer* sem perda da integridade da parede. No entanto a reticulação química novamente foi mais eficiente quanto ao controle da liberação do composto hidrofóbico utilizando liberação em meio alcoólico. No entanto Prata *et al* (2008) e Alvim (2005) utilizaram quantidades baixas de enzima o que pode ter produzido os resultados observados.

Considerando os resultados acima citados o presente trabalho teve como objetivo estudar o efeito da adição de diferentes concentrações de transglutaminase na microencapsulação como agente reticulante e na liberação de oleoresina de páprica utilizada como material de núcleo em micropartículas produzidas por coacervação complexa (gelatina-goma arábica), sendo a liberação estudada em óleo de girassol. Adicionalmente a ordem de preparo da emulsão,

primeiro gelatina/oleoresina de páprica-óleo de soja ou goma arábica/oleoresina de páprica-óleo de soja para a produção e reticulação foi estudada.

O efeito do tipo e quantidade do reticulante enzimático sobre a resistência das micropartículas a condições drásticas de pH, temperatura e condições entéricas foi também estudado em comparação a micropartículas reticuladas com glutaraldeído.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Microencapsulação**

A microencapsulação é um processo utilizado para recobrir sólidos, líquidos ou material gasoso como ingrediente ativo encapsulado dentro de um segundo material com a finalidade de isolar total ou parcialmente a substância de interesse do ambiente, que pode posteriormente liberar seu conteúdo de forma controlada e em condições específicas (SPARKS, 1981). O ativo pode ser liberado em diferentes intensidades dependendo das propriedades dos revestimentos aplicados (JACKSON & LEE, 1991).

O conceito de microencapsulação tem sua origem na idealização do modelo celular no qual o núcleo é envolvido por uma parede semipermeável que o protege do meio externo e ao mesmo tempo controla a entrada e saída de substâncias na célula, que, de maneira similar, tem uma parede que isola o material ativo e controla a liberação sob estímulo específico. Portanto, o propósito da microencapsulação é proteger seu conteúdo do ambiente que pode ser destrutivo, permitindo trocas pela membrana (JIZOMOTO *et al.*, 1993).

Os primeiros registros de tentativa de aplicações dessa idéia datam dos anos 30. O primeiro produto com material microencapsulado surgiu em 1954, com a patente do papel de cópia sem carbono comercializado pela empresa norte-americana National Cash Register, que consistia no recobrimento de papel comum por uma fina camada de microcápsulas contendo tinta incolor. As microcápsulas quando rompidas (por pressão) liberavam a tinta que, ao entrar em contato com uma segunda folha previamente banhada num revelador, produzia a cópia nos pontos pressionados. As primeiras pesquisas na área farmacêutica, realizada pela Universidade de Wisconsin (Estados Unidos), também datam dos anos 50 (RÉ, 2003).

A classificação das partículas é feita de acordo com parâmetros morfológicos de tamanho e distribuição do material do recheio. As partículas podem assumir diferentes formas como uma simples membrana de cobertura,

uma membrana esférica ou de forma irregular, estrutura de multiparedes de mesmas ou várias composições ou numerosos núcleos em uma mesma estrutura (GIBBS *et al.*, 1999). Também, de acordo com a estrutura interna, podem ser classificadas em esferas, quando não se pode diferenciar o núcleo (sistema monolítico) e cápsulas, quando o sistema é do tipo reservatório em que o(s) núcleo(s) é bem definido e envolto por um filme polimérico. São denominados micro, as partículas com tamanho entre 1 a 100 µm (THIES, 1995).

A composição dos encapsulantes depende do tipo de aplicação a que se destinam e podem variar de comestíveis (carboidratos, proteínas) a polímeros biodegradáveis ou sintéticos. Existe uma variedade de materiais de paredes a serem utilizados para a formação de microcápsulas com particular eficiência e propriedades de liberação no método de formação escolhido. A estabilidade dos compostos contra a oxidação é também influenciada pela natureza química dos polímeros formadores de parede (ARSHADY, 1993; SINKO & KOHN, 1993).

Diferentes métodos são utilizados para a produção de microcápsulas, em geral podem ser divididas em três grupos: **físico-químicos**: coacervação simples ou complexa (separação de fase aquosa), evaporação emulsão-solvente (separação por fase orgânica), emulsão-solidificação, envolvimento lipossômico; **métodos físicos**: *spray drying*, *spray coating*, *spray chilling*, leite fluidizado, extrusão, centrifugação com múltiplos orifícios, co-cristalização, liofilização; **métodos químicos**: polimerização interfacial, inclusão molecular (JACKSON & LEE, 1991; DZIEZAK, 1988; RÉ, 1998; GIBBS *et al.*, 1999).

A escolha do processo de encapsulação depende das propriedades físico-químicas, tanto do material ativo, quanto do agente encapsulante (especialmente a solubilidade) e do tipo de micropartícula procurada (proteção e mecanismos desejáveis de liberação) (JACKSON & LEE, 1991), além da finalidade (morfologia, estabilidade) e das circunstâncias envolvidas na manufatura do produto.

As vantagens associadas a encapsulação dos materiais de recheio além da função de proteção incluem conversão de substâncias líquidas ou gasosas em



sólidos, capacidade de mascarar propriedades indesejáveis do recheio encapsulado e possibilidade de liberação das substâncias encapsuladas de forma controlada e sob condições específicas (SHAHIDI & HAN, 1993; GOUIN, 2004).

Fundamentalmente, o material de parede não deve reagir com o recheio e nem ser solúvel neste, sendo que os dois muitas vezes têm polaridades opostas, ou seja, recheios de características apolares são microencapsulados por materiais de parede polares e vice-versa (BAKAN, 1973; JACKSON & LEE, 1991; CARDOSO, 2000).

Em alguns casos, quando se desejam características especiais de solubilidade, rigidez, dentre outras, os polímeros podem ser submetidos a alterações pelo uso de plastificantes, reticulantes, enzimas, modificadores químicos, tratamentos na superfície e múltiplas coberturas (JACKSON & LEE, 1991; RÉ, 1998; LAMPRECHT *et al.*, 2000; 2001; LEE & ROSENBERG, 1999; KRUIF *et al.*, 2004).

## **2.2 Aplicação da microencapsulação na indústria de alimentos**

A microencapsulação é usada quando o recheio requer proteção, e quando se visa reduzir a reatividade do material de núcleo com o ambiente, aumentar a estabilidade do produto, facilitar a manipulação do material encapsulado, converter líquidos em sólidos, mascarar sabor e odor desagradáveis e promover a liberação controlada do componente ativo em taxas diferentes do que se administrado livremente. Em função da variedade de propósitos, as microcápsulas vêm sendo adaptadas a importantes ramos tecnológicos (RENARD, *et al.*, 2002; SHAHIDI & HAN, 1993).

Os ingredientes ativos adicionados aos alimentos incluem aromas, corantes, temperos, acidulantes, vitaminas, lipídeos, aminoácidos, minerais e outros como os microorganismos probióticos e aditivos naturais. Eles têm função de alterar a textura, melhorar a qualidade nutricional, aumentar a vida de prateleira ou controlar as propriedades dos alimentos processados. A técnica da

microencapsulação aplica-se como forma de reter compostos voláteis, proteger esses ingredientes contra perdas nutricionais (efeitos de evaporação e umidade, oxigênio e luz ultravioleta), auxiliar na mistura e preservar ou mascarar cor e sabores (inibindo a reação com outros materiais), além de incorporar aos alimentos, mecanismos de controle da liberação de certos componentes (RÉ, 2003; KAILASAPATHY, 2006).

Na Tabela 2.1, são apresentados os principais agentes encapsulantes utilizados na indústria de alimentos. Acidulantes como o ácido ascórbico, cítrico, fumárico e láctico são adicionados ao processamento por atuarem como preservantes e agentes modificadores de sabor, para evitar a oxidação, porém a interação com gomas, amidos, proteínas e pectinas pode desenvolver uma grande faixa de texturas. A encapsulação desses compostos aumenta a vida útil de compostos de aromas cítricos e alimentos contendo amido e previne perda de voláteis e cor por serem liberados em condições específicas (DZIEZAK, 1988).

**Tabela 2.1.** Ingredientes alimentícios que são encapsulados.

Tipos de ingredientes
Agentes aromatizantes como óleos, pimentas, adoçantes e especiarias
Ácidos, bases e tampões
Lipídeos
Agentes redutores (branqueadores, maturantes)
Enzimas e microorganismos
Antioxidantes
Preservantes
Corantes
Agentes de <i>crosslinking</i> e <i>setting</i>
Agentes com sabores e odores indesejáveis
Óleos essenciais, aminoácidos, vitaminas e minerais

Fonte: Adaptada de KIRBY *et al.* (1991).

A microencapsulação protegeu e aumentou a estabilidade das vitaminas em condições extremas de umidade e de temperatura, permitiu a liberação controlada no trato intestinal (JANOVSKY, 1993).

Giese (1993) reportou a aplicação de compostos ativos como: condimentos, aromatizantes, corantes e ingredientes nutritivos microencapsulados, contidos em sachês feitos de filmes comestíveis, que se dissolvem instantaneamente em macarrões e sopas de preparo rápido.

Segundo Jackson & Lee (1991), fazer um composto aromatizante líquido comportar-se como sólido é a principal aplicação da tecnologia de microencapsulação na indústria de alimentos.

Os compostos edulcorantes são microencapsulados com a finalidade de diminuir a higroscopicidade (DZIEZAK, 1988), aumentar a fluidez, a resistência a altas temperaturas e prolongar a sensação de doçura (JACKSON & LEE 1991).

A microencapsulação dos corantes têm como finalidade protegê-los contra oxidação, aumentando sua vida de prateleira e propiciando a incorporação nos alimentos (BEATUS *et al.*, 1985; SANTOS *et al.*, 2001)

Os microorganismos têm sido microencapsulados para protegê-los contra a presença de oxigênio (KIM *et al.*, 1988), contra as baixas temperaturas de congelamento (SHEU *et al.*, 1993), contra o efeito bactericida do suco gástrico e outros meios ácidos (RAO *et al.*, 1989; MODLER & VILLA-GARCIA, 1993; DINAKAR & MISTRY, 1994; KHALIL & MANSOUR, 1998; CUI *et al.*, 2000; FÁVARO-TRINDADE & GROSSO, 2000; SULTANA *et al.*, 2000; FÁVARO-TRINDADE & GROSSO, 2002; HANSEN *et al.*, 2002), para retirá-los do produto, interrompendo a acidificação (CHAMPAGNE & COTE, 1987).

### 2.3 Microencapsulação por coacervação complexa

A coacervação é um fenômeno de separação espontânea de fases baseada numa interação eletrostática entre dois polímeros com cargas opostas em quantidades iguais que se associam formando um complexo neutro que precipita (THIES, 1995; STRAUSS & GIBSON, 2004). Este termo é oriundo do latim "co" (união) e "acervus" (agregação) significando união e agregação de partículas (VANDERGAER, 1974; TOLSTOGUZOV, 1997; MENDER *et al.*, 2000; STRAUSS & GIBSON, 2004).

Interações entre proteínas e polissacarídeos têm relevância para muitos sistemas biológicos (organização de células vivas) e na indústria de alimentos é utilizada para controlar a estrutura, a textura e a estabilidade dos alimentos. As proteínas contribuem para formação e estabilidade de emulsões, enquanto que os polissacarídeos atuam como espessantes e agentes de ligação de água. Em qualquer situação, moléculas de proteína e polissacarídeo podem ser atraídos (complexação) ou repelidos mutuamente (segregação) (DICKINSON, 1998; TOLSTOGUZOV, 1996).

A formação dos complexos de polímeros deve-se principalmente às interações eletrostáticas que dependem do grau de ionização dos polímeros e, do pH (WEINBRECK *et al.*, 2004). Coacervar depende, da carga líquida do sistema, sendo conseqüentemente influenciada pela estequiometria, por parâmetros estruturais (conformação e comprimento de cadeia apropriados) dos polímeros, e pelas condições do meio como pH, força iônica, temperatura e natureza dos reagentes.

As microcápsulas obtidas por coacervação podem ter uma faixa ampla de diâmetros e alta eficiência de encapsulação (PEDROZA-ISLAS, 2002). A principal desvantagem da técnica de encapsulação por coacervação é o fato de se manter um controle crítico das concentrações do material coloidal e do iniciador da coacervação, pois a coacervação ocorrerá somente dentro de uma limitada faixa de pH, concentração de colóide e/ou concentração do eletrólito (RÉ, 2003).

A coacervação complexa é favorável por não utilizar solventes orgânicos nem altas temperaturas. Micropartículas produzidas por coacervação complexa são funcionalmente adequadas a encapsulação de materiais hidrofóbicos. A taxa de permeabilidade de compostos químicos através da estrutura de rede de um polímero é dependente da habilidade de inchamento da micropartícula, a qual é influenciada por diversos fatores tais como densidade, reticulação, cristalinidade, porosidade, hidrofiliicidade, e a própria estrutura química do polímero (AKIN & HASIRCI, 1995). As partículas coacervadas têm recebido atenção recentemente pela possibilidade de uso em sistemas de liberação controlada de compostos ativos (KRUIF *et al.*, 2004), em aplicações farmacêuticas, cosméticas e alimentícias (SCHROOYEN, *et al.*, 2001).

Os biopolímeros geralmente usados para microencapsulação por coacervação são aqueles que têm propriedades coloidais hidrofílicas, possuem solubilidade em meio aquoso, densidades de cargas adequadas e cadeias lineares, como a gelatina, alginato, albumina, caseína, agar, gomas, pectinas, etc. (THIES, 1995). Os biopolímeros mais utilizados em sistemas de coacervação são gelatina/goma arábica (JEGAT & TAVERDET, 2000, 2001).

Alto rendimento da microencapsulação por coacervação complexa está associada às características do complexo formado, do recheio e das condições ótimas para a complexação dos pares poliméricos. A tensão superficial do sistema, capacidade de adsorção dos polímeros ao recheio disperso, polaridade do recheio, viscoelasticidade do complexo, são propriedades de grande importância para a correta formação da parede e, conseqüentemente, interferem na eficiência de retenção do material. Em geral, compostos líquidos ou particulados de caráter hidrofóbico ou partículas sólidas de baixa solubilidade, são facilmente encapsulados por esse processo (SCHMITT *et al.*, 1998; KRUIF *et al.*, 2004).

Uma possível alternativa para modificar as propriedades da barreira das microcápsulas produzidas por coacervação é a modificação da rede polimérica através da reticulação das cadeias dos polímeros, resultando em microcápsulas

resistentes ao esforço mecânico e condições drásticas de temperatura . A presença de um grupo funcional reativo na cadeia de aminoácidos das proteínas torna o processo de *crosslinking* possível através de tratamentos químicos, físicos ou enzimáticos (HERNANDEZ-MUÑOZ *et al.*, 2004).

Outras limitações da encapsulação por coacervação são: evaporação dos compostos voláteis, solubilidade do material ativo no solvente e oxidação do produto, porque os materiais residuais do núcleo se aderem às vezes ao exterior da micropartícula (MILES *et al.*, 2005).

### **2.3.1 Parâmetros físico-químicos**

#### **2.3.1.1 Tipos de forças químicas**

Quando os biopolímeros colidem, outras forças de interação diferentes das eletrostáticas podem induzir a formação de complexos macromoleculares devido às interações intermoleculares das macromoléculas com cargas opostas, entre os resíduos de suas cadeias laterais ou pelas interações entre outros grupos funcionais dos biopolímeros. As interações podem ser de dois tipos: ligações específicas ou interações não-específicas. Os dois tipos de interações não-específicas entre os biopolímeros, às forças atrativas e repulsivas se aplicam a dois fenômenos opostos de separação de fases: a incompatibilidade e a complexação entre os biopolímeros (BUROVA *et al.*, 1992; TOLSTOGUZOV, 2003).

A força e a especificidade atrativa ou repulsiva destas interações são variáveis. As interações moleculares repulsivas são não-específicas e geralmente são devido às forças de van der Waals ou às repulsões estéricas (HIEMENZ & RAJAGOPALAN, 1997). São encontradas geralmente entre misturas de proteína/polissacarídeo aniônicos ou não-iônicos abaixo do ponto isoelétrico da proteína (IMESON *et al.*, 1997). As interações atrativas não-específicas são consequência de muitas interações fracas como interações iônicas, hidrofóbicas ou ligações de hidrogênio, mas também podem ser específicas, de intensidade

elevadas e permanentes (ligações covalentes), no entanto, são poucas moléculas envolvidas em ligações específicas (ZUCKERKANDL, 1975).

#### **2.3.1.2 pH**

A influência do pH determina principalmente o grau de ionização dos grupos funcionais dos biopolímeros, como as cadeias laterais dos aminoácidos das proteínas, os grupos aminas e os grupos carboxílicos. Assim, as cargas dos biopolímeros são os principais parâmetros que influenciam a formação dos coacervados (SINGH & BURGESS, 1989; BURGESS, 1990), e como a formação de complexos entre os polímeros geralmente resulta de interações eletrostáticas entre macromoléculas carregadas com cargas opostas, trabalha-se com esta variável para adequar-se à situação de máxima concentração de cargas opostas. Devido à influência do pH, o máximo rendimento para a complexação entre polipeptídios e polissacarídeos aniônicos é obtido em valores de pH abaixo do ponto isoelétrico dos polipeptídios, condição onde polipeptídios e polissacarídeos têm cargas opostas, produzindo a máxima carga eletrostática. Os polissacarídeos contendo carboxilas aniônicas, por sua vez, atuam como poliânions e em contato com as proteínas formam complexos eletrostáticos em valores de pH variando, geralmente, de 2 a 5. Os complexos interbiopolímeros são desfeitos geralmente quando a força iônica excede 0,2 a 0,5 e quando o pH está acima do ponto isoelétrico do polipeptídio. Proteínas oligoméricas podem ainda formar complexos em valores de pH acima do  $pI$  da proteína em função das diferentes cargas de suas subunidades (GALAZKA *et al.*, 1999). O pH de coacervação do sistema gelatina-goma arábica pode variar na faixa de 3,0 a 5,0 dependendo da origem dos polímeros (THIES, 1995; IJICHI *et al.*, 1997; MENDER & SYKES, 1998; BURGESS & PONSART, 1998; LAMPRECHT *et al.*, 2000; 2001).

#### **2.3.1.3 Massa molar**

Devido à natureza rígida das interações eletrostáticas entre polipeptídios e polissacarídeos, o efeito da massa molar dos polissacarídeos sobre a

quantidade dos polipeptídios complexadas é desprezível (MORR & HA, 1993). Quando as interações são fracas, um polissacarídeo de alta massa molar complexa uma quantidade maior de polipeptídio e o maior espaço ocupado na solução favorece o contato com a proteína e há um aumento na formação de coacervados (SEMENOVA, 1996). Porém, proteínas de alta massa molar tendem a formar preferivelmente géis ou precipitados do que a complexos. Por outro lado moléculas com baixa massa molar interagem formando agregados moleculares.

#### **2.3.1.4 Razão específica dos biopolímeros no sistema de coacervação complexa**

O máximo rendimento em processos de coacervação é obtido por uma razão específica de cada sistema. Schmitt *et al.*, (1998) observou que para a formação de complexos entre a  $\beta$ -Lactoglobulina e goma acácia é 4:1, respectivamente.

Além de outras variáveis a estequiometria de um complexo eletrostático depende da conformação e da carga total dos reagentes. Proteínas globulares e polissacarídeos aniônicos rígidos não conseguem contato entre todos seus grupos carregados. Ao contrário, estruturas de proteínas desdobradas (caseína, gelatina e algumas globulinas desnaturadas em meio ácido) tendem a formar o máximo contato com um polissacarídeo com carga oposta (TOLSTOGUZOV, 2003).

#### **2.3.2 Parâmetros físicos do processo de coacervação complexa**

Muitos estudos têm reportado (LAMPRECHT *et al.*, 2001) o efeito de fatores físicos como a temperatura, velocidade de agitação e pressão no processo de coacervação complexa.



### **2.3.2.1 Efeito da temperatura na coacervação complexa**

A temperatura influencia a formação de complexos entre polissacarídeos e polipeptídios. Kelly *et al* (1994) verificaram que o aumento de temperatura e o conteúdo total de polímeros possuíam um efeito sinérgico na separação de fases. O incremento da temperatura influencia as interações hidrofóbicas que são essenciais na estabilização térmica dos complexos onde baixas temperaturas favorecem as ligações de hidrogênio, causando efeitos positivos na formação de complexo polipeptídio-polissacarídeo (STAINSBY, 1980). Também o aumento da temperatura permite mudanças na conformação da estrutura do polissacarídeo e desnaturação térmica das proteínas globulares.

### **2.3.2.2 Efeito da agitação e pressão na coacervação complexa**

A aplicação de pressão alta tem importância para a formação de complexos entre polissacarídeos e polipeptídios. O tratamento conduz a desnaturação parcial dos polipeptídios e permite a exposição das cadeias que reagem, inicialmente não expostas na macromolécula (DICKINSON & PAWLOWSKI, 1997). No caso de altas pressões dinâmicas combinadas com a ação das forças de turbulência, cavitação e cisalhamento, há redução no tamanho dos complexos (LE HÉNAFF, 1996). O tempo do cisalhamento influencia o tamanho dos complexos formados. Quanto maior o tempo, maior a possibilidade de colisões e de formação de complexos maiores (SCHMITT *et al.*, 1998).

## **2.4 Materiais de parede para coacervação complexa**

Um dos principais fatores que influenciam a estabilidade de compostos encapsulados é a natureza do material encapsulante (SHAHIDI & HAN, 1993). Os materiais poliméricos utilizados como encapsulantes devem atender a requisitos como: propriedades emulsificantes, propriedades formadoras de filme envolvente, baixa higroscopicidade, baixa viscosidade em altas concentrações de sólidos, solúveis, sabor e odor agradável e de fácil reconstituição e baixo custo. Nenhum

material encapsulante apresenta a totalidade das propriedades desejáveis, por isso, na prática, utilizam-se misturas. Geralmente utilizam-se, como agente encapsulantes hidrocolóides, como proteínas gelificáveis e carboidratos por sua diversidade e baixo custo (SHAHIDI & HAN, 1993).

#### 2.4.1 Goma arábica



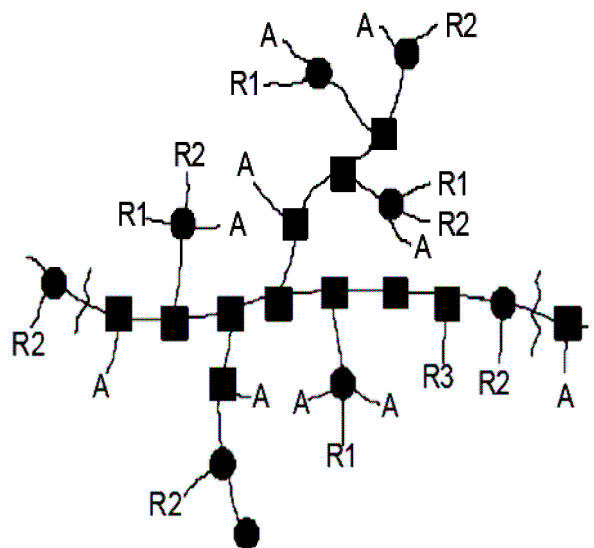
**Figura 2.1.** Goma arábica: *Acacia tortilis*, in natura e processada (*spray dryer*)

A goma arábica é a mais antiga das gomas conhecidas (2650 a.C.). O uso da goma arábica vem pelo menos desde o antigo Egito, onde era utilizada na confecção de cosméticos e de perfumes e como ingrediente no processo de mumificação e recentemente como adesivo nos selos postais. É originária do Sudão (África), segundo Osman *et al* (1993). Seu uso mais conhecido, entretanto é como espessante e estabilizante para emulsões alimentícias (ROLINSON, 1991).

É a goma mais usada como material de parede na microencapsulação de “flavors”. Suas características de alta solubilidade, viscosidade baixa em altas concentrações, características da emulsificação e sua boa retenção na encapsulação de compostos voláteis a tornam muito versátil para a maioria dos processos de microencapsulação. Apresenta, porém a desvantagem de alto custo comparado com outros materiais como a maltodextrina (KENYON, 1995; SHIGA *et al.*, 2001).

Quimicamente, a goma arábica é um sal neutro ou levemente ácido composto de polissacarídeos que contêm íons cálcio, magnésio e potássio em sua molécula e múltiplas glicoproteínas (PRAKASH & MANGINO, 1990). Segundo Bemiller & Whistler (1996) é uma mistura complexa de duas frações distintas, com estruturas químicas diferentes. A primeira fração, o componente principal, representa 70% da goma arábica e é composta por cadeias de polissacarídeos com pouco ou nenhum material nitrogenado. A segunda fração é formada por aproximadamente 2% de glicoproteínas ligadas covalentemente ao carboidrato através dos resíduos de serina e de hidroxiprolina (OSMAN *et al.*, 1993; RANDALL *et al.*, 1988). A estrutura da proteína tem elevada massa molar e representa perto de 30% da macromolécula (VANDEVELDE & FENYO, 1985). A fração protéica parece ser responsável pelas propriedades emulsificante e estabilizante da goma arábica (RANDALL *et al.*, 1988).

A goma arábica é um polieletrólito carregado negativamente acima do pH correspondente ao seu  $pK_a$  (pH~2,2), e em baixos valores de pH a dissociação dos grupos carboxilas é suprimida. Ela apresenta boa capacidade emulsificante e sua estrutura ramificada forma soluções de baixa viscosidade, facilitando o uso de altas concentrações comparado a outros polissacarídeos de massa molar semelhante (400KDa) (SANCHEZ *et al.*, 2002). De sua estrutura molecular (Figura 2.2), pode-se estimar sua densidade de carga como um grupo carboxílico a cada 5nm (ISLAM *et al.*, 1997). Além disso, a goma pode estabilizar a emulsões de óleos aromatizantes em bebidas (TAN, 1990) e protegê-lo contra oxidação de voláteis durante processamento e estocagem de microcápsulas (BUFFO *et al.*, 2001).



**Figura 2.2.** Estrutura molecular da goma arábica. A = arabinosil; Radicais baseados em R1= ramnose, R2=ácido glucurônico, R3= arabinose. Adaptado de ISLAM *et al.* (1997).

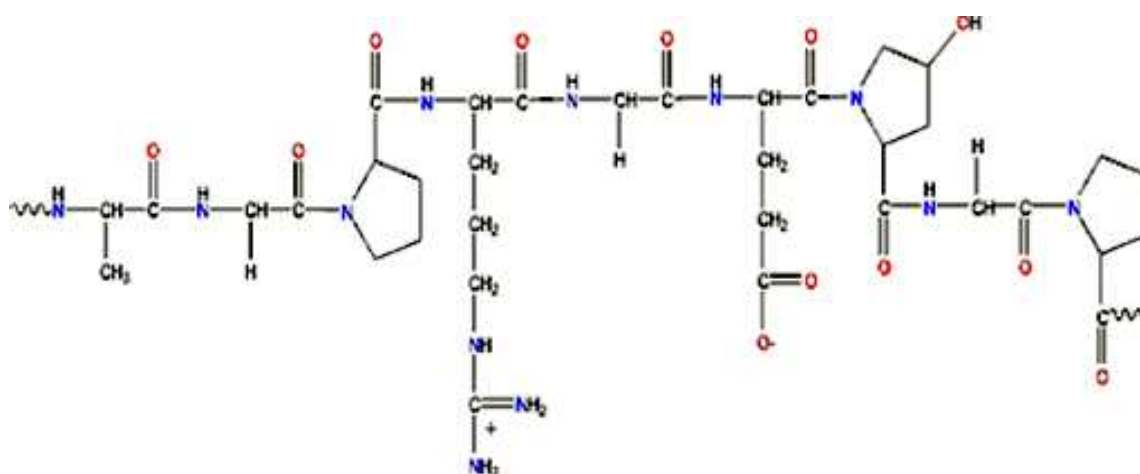
#### 2.4.2 Gelatina

A gelatina é uma proteína de alta massa molar, de natureza hidrofílica, derivada da desnaturação de colágeno. A dissociação térmica ou química das cadeias polipeptídicas do colágeno produz a gelatina. (ARVANITOYANNIS, 2002). O colágeno e a gelatina são diferentes formas da mesma macromolécula, sendo possível descrevê-la como colágeno hidrolisado (LEDWARD, 1986 citado por MONTERO & GÓMEZ-GUILLÉN, 2000). Quando o colágeno é produzido pelo processo ácido, classifica-se a gelatina resultante em tipo A e, pelo processo básico, gelatina tipo B (ARVANITOYANNIS, 2002).

A extração da gelatina a partir do colágeno é realizada com diferentes temperaturas (de 60°C a 90°C) e é pH-dependente, sendo que a seleção do pH é feita visando-se maximizar a taxa de extração e manutenção de suas propriedades físicas (CARVALHO, 2002). Suas propriedades reológicas são influenciadas pela fonte, idade do animal e tipo de colágeno (LEDWARD, 1986 citado por MONTERO & GÓMEZ-GUILLÉN, 2000) além das características dos

processos de extração e degradação molecular (LEUENBERGER, 1991). O tipo de pré-tratamento químico e parâmetros de extração podem influenciar o tamanho das cadeias polipeptídicas e propriedades funcionais da gelatina.

Gelatinas (Fig. 2.3), como outras proteínas, podem agir como ácido ou base, dependendo do pH do meio. Em soluções ácidas, apresentam-se positivamente carregadas e, o contrário ocorre em soluções alcalinas. Porém, variações na proporção de grupos amídicos e carboxílicos são responsáveis por diferenças nos pontos isoelétricos da gelatina. No colágeno, 35% dos grupos ácidos estão sob a forma de amidas, o que o caracteriza como uma proteína básica ( $pI \sim 9,4$ ). De acordo com o pré-tratamento de hidrólise utilizado, o ponto isoelétrico da gelatina extraída é alterado ficando em torno de 4,5 a 5,3 para gelatinas tipo B (pré-tratamento com pH alcalino) e permanecendo entre 7,0 a 9,4 na gelatina tipo A (pré-tratamento ácido) (POPPE, 1997).



**Figura 2.3.** Estrutura química da gelatina (POPPE, 1997)

As propriedades mais importantes na caracterização das gelatinas são a solubilidade em água, a capacidade de formação de gel termo-reversível, viscosidade e ponto de fusão e são afetadas pelos seguintes fatores: concentração da solução de gelatina, tempo e temperatura de maturação do gel, pH e conteúdo de sal (CHOI & REGENSTEIN, 2000).

Os coacervados produzidos utilizando gelatina submetidos a *crosslinking* apresentam aumento nas propriedades, mecânica, térmica, e baixa capacidade de absorção de água. Estas características de materiais a base de gelatina têm inúmeras aplicações no desenvolvimento de novos ingredientes para alimentos (STRAUSS & GIBSON, 2004).

## **2.5 Material de recheio**

A coacervação complexa é tipicamente usada para encapsular materiais hidrofóbicos incluindo óleos essenciais, oleoresinas, óleos de soja, de pescado e algumas vitaminas lipossolúveis (A, D, E, K).

### **2.5.1 Páprica**

A páprica contém uma faixa grande de pigmentos dos quais 20 a 30 foram inteiramente identificados. Normalmente a mudança da coloração da páprica é resultado da degradação da clorofila e aumento considerável do conteúdo de carotenóides, que são influenciados pela temperatura e iluminação a qual o fruto é exposto (VARÓN-CASTELLANOS & NAVARRO-ALBALADEJO, 1996). Os pigmentos responsáveis pela cor da páprica, basicamente os vermelhos e os amarelos são carotenóides, que se misturam para dar a sua coloração total (GÓMEZ-LADRÓN DE GUEVARA *et al.*, 1996).

A intensidade da cor do pimentão é o fator essencial da qualidade deste produto (GIMÉNEZ *et al.*, 1984). A cor da páprica é influenciada pela quantidade de pigmentos presentes,  $\beta$ -caroteno, criptoxantina, zeaxantina e luteína são

amarelos, e os capsantina e capsorubina que compreendem de 70 a 80% do total de carotenóides da páprica contribuem unicamente para a coloração vermelha (OSUNA-GARCIA *et al.*, 1997).

É comercializada em duas formas, a) em pó (pó insolúvel, vermelho-marrom, proveniente de frutos selecionados, maduros, secos e moídos) e b) oleoresina (extrato oleoso dos pigmentos). Ambos apresentam cores vermelhas e amarelas características da classe de pigmentos da qual fazem parte (BIACS *et al.*, 1992). Oleoresina de páprica é o extrato líquido obtido em forma de óleo viscoso que possui todas as propriedades da especiaria, com intensa cor vermelha e com aroma típico do pimentão. Normalmente apresenta alta qualidade, propriedades antioxidantes naturais, consistência, aroma, cor e sabor pungentes (BORGES *et al.*, 1997).

A oleoresina da páprica é avaliada por sua cor e deste parâmetro depende o seu valor comercial (MÍNGUEZ-MOSQUERA *et al.*, 1992; NAVARRO & COSTA, 1993). Sua utilização elimina inconvenientes presentes no pó do pimentão, tais como acentuada perda de cor e facilidade de infestação por insetos e mantém as características apreciadas do condimento (BORGES *et al.*, 1997). Entretanto, esta deve ser protegida contra fatores que facilitam a sua oxidação, como oxigênio, temperatura, luz e umidade (BEATUS *et al.*, 1985).

Os pigmentos da páprica, nas formas livre ou encapsulada, são extensamente utilizados em pratos preparados que usam carnes como ingredientes, molhos para saladas, sopas, margarinas, maioneses, queijos, sucos vegetais, fármacos e cosméticos (TODD, 1957; GUADAYOL *et al.*, 1997; HANSEN, 1997).

Segundo Winning (1995), a encapsulação pelo método de *spray drying*, das gotículas contendo os corantes cúrcuma, páprica, carmim e urucum, é suficiente para mudar suas características, ou seja, de instáveis passam a estáveis, de solúveis em gorduras a solúveis em água, de óleo líquido para pó sólido, de coeso para fluxo livre. Adicionalmente os corantes microencapsulados possuem propriedades de dissolução superiores aos convencionais encontrados

em pós; dispersam facilmente em água fria ou quente e a solução final é sempre transparente, independente do valor de pH. Ainda, segundo este autor, a microencapsulação evita o problema de contaminação cruzada que se verifica quando se utiliza o corante em pó.

### 2.5.2 Timol

Timol é um terpeno encontrado nos óleos essenciais de tomilho (*Thymus vulgaris*), orégano (*Origanum vulgare*) e espécies afins que têm o cheiro característico de tomilho. O óleo essencial de tomilho e seus ingredientes exibem forte atividade antimicrobiana. Apresentam também atividade antioxidante (AYDIN *et al.*, 2005). Eugenol e timol são os principais constituintes fenólicos de óleos de cravo e tomilho (DHAR *et al.*, 1993).

O timol apresenta estrutura fenólica, com propriedades farmacológicas, que incluem efeitos antimicrobianos e antioxidante. A atividade antibacteriana e antimicótica de timol já é bem conhecida, tendo-se observado que esta molécula tem atividade antiinflamatória e antioxidante. Estas duas últimas características fazem com que a molécula de timol possa ter efeitos úteis para controlar processos inflamatórios presentes em muitas infecções (BRAGA *et al.*, 2006; ROBLEDO *et al.*, 2004).

Encapsulação de timol e geraniol em  $\beta$ -ciclodextrina e amido modificado aumentou a solubilidade dos compostos ativos em água. Os experimentos de liberação mostraram que geraniol encapsulado em amido modificado foi quantitativamente liberado na água, enquanto que uma parte significativa (70%) de timol encapsulado em amido modificado permaneceu retida (MOURTZINOS *et al.*, 2008). Os autores concluíram que os terpenos encapsulados com  $\beta$ -ciclodextrina e amido modificado podem ser utilizados como aditivos para alimentos, sendo adicionados como agentes de sabor, com a vantagem de apresentarem maior estabilidade (MOURTZINOS *et al.*, 2008).



## 2.6 Propriedades de parede - Agentes reticulantes

Uma grande variedade de materiais de parede é utilizada na produção de micropartículas e microesferas para a liberação controlada de materiais de recheio. Para a coacervação complexa, aproximadamente 90% dos pares fazem uso de uma proteína como par polimérico em geral, a gelatina. Observando-se a formação estrutural do colágeno, percebeu-se que a ligação covalente entre as moléculas era essencial para a função dos tecidos conectivos como tendões, ossos e pele, por possuírem características de maior resistência mecânica e controlarem o grau de flexibilidade das cadeias polipeptídicas. Na ausência desses *crosslinkings* intermoleculares, as moléculas de polipeptídeos são capazes de movimentar-se relativamente às outras; conseqüentemente, a fibra é fraca e extensível (MILES *et al.*, 2005).

A reticulação é utilizada para alterar as propriedades de barreira das paredes das micropartículas propiciando o controle da liberação do recheio microencapsulado. Geralmente são reticulações protéicas e referem-se à formação de ligações covalentes na própria cadeia polipeptídica (intramoleculares) ou entre proteínas (intermoleculares) (FEENEY & WHITAKER, 1984). Nem todos os aminoácidos são passíveis de participação no processo de *crosslinking* e os que reagem diferem em grau de reatividade sob várias condições (GERRARD, 2002).

Entre os grupos presentes nas proteínas, os resíduos das aminas usualmente estão expostos e são muito reativos sem qualquer tipo de prévia ativação (MATEO *et al.*, 2005). Por isso muitos agentes reticulantes são formulados para atacar especificamente estes grupos. A gelatina por exemplo, contém aproximadamente 33 grupos  $\epsilon$ -amino e 120 grupos de ácidos carboxílicos em uma molécula ideal de 100 kDa composta de 1000 resíduos de aminoácidos (VEIS & ARANYI, 1960).

Estudos vêm sendo realizados com a reticulação química ou enzimática das proteínas, com o intuito de melhorar as propriedades de barreira de filmes à base de gelatina (CARVALHO & GROSSO, 2004; CHAMBI & GROSSO, 2006) ou

melhorar a modulação e liberação de materiais de recheio, bem como a resistência mecânica das microcápsulas produzidas por coacervação complexa com gelatina e goma arábica. Carvalho & Grosso (2004) estudaram o efeito dos agentes reticulantes transglutaminase, formaldeído e glioxal sobre as propriedades de barreira de filmes de gelatina. Os resultados indicaram uma redução de 20% da solubilidade para todos os filmes reticulados, enquanto **que a redução** à permeabilidade ao vapor de água foi maior para o filme reticulado com a transglutaminase. Por outro lado, a melhora das propriedades mecânicas dos filmes foi observada somente para o filme reticulado com o formaldeído. Chambi & Grosso (2006) utilizaram *crosslinking* enzimático com transglutaminase a partir de hidrolisados protéicos observando que o sistema não foi adequado para produzir bons filmes. A ação da enzima aumentou a elongação dos filmes e a permeabilidade ao vapor de água.

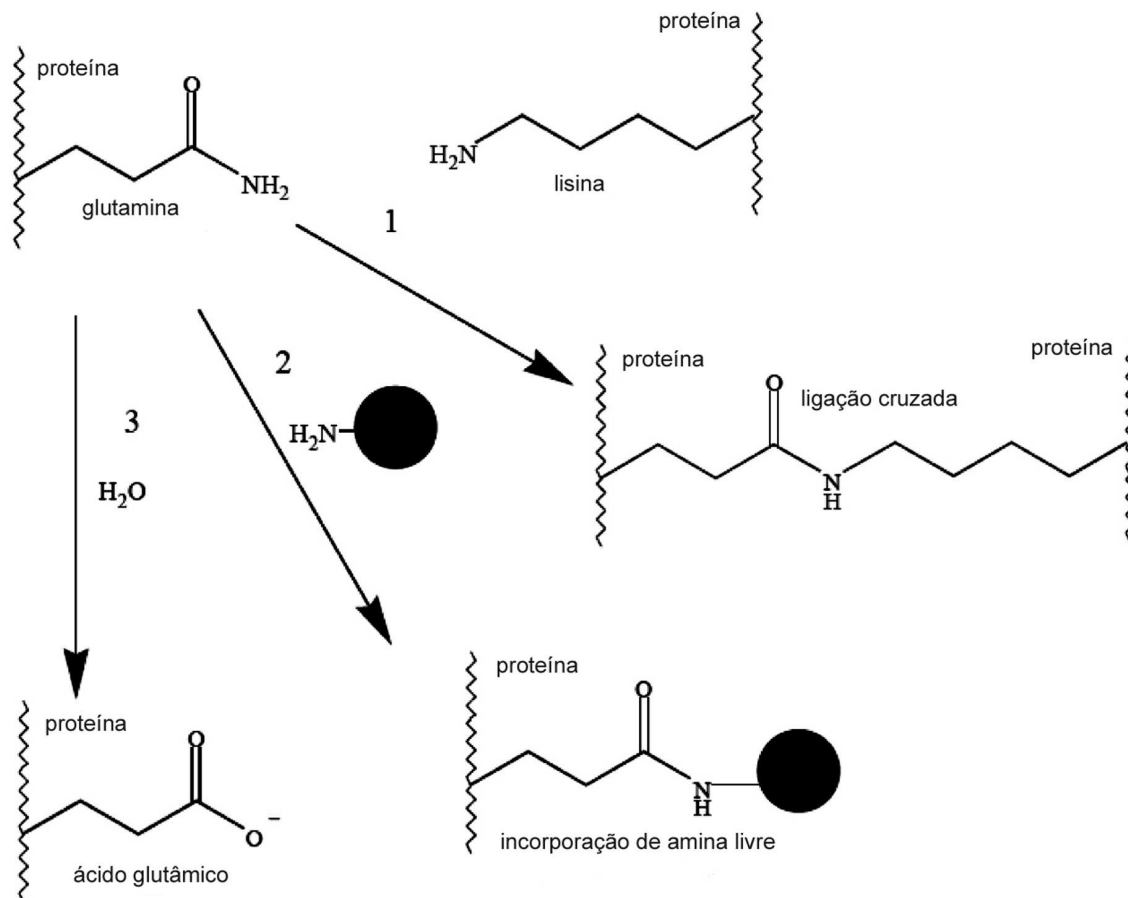
No entanto, o grau e o tipo de reticulação podem diferir de acordo com o agente reticulante. Métodos físicos como o tratamento dehidrotérmico (DHT), fotoxidação, microondas e irradiação ultravioleta (RAY-NENG *et al.*, 2005) também podem ser empregados, em alguns casos.

### 2.6.1 Transglutaminase

A enzima transglutaminase (TG) tem recebido ampla atenção recentemente por apresentar a capacidade de reticular proteína, sendo uma alternativa para melhorar a estrutura da parede da micropartícula, facilitando seu uso em alimentos. No passado, a baixa disponibilidade e o alto custo dessa enzima limitavam sua aplicação. Hoje a transglutaminase pode ser obtida de fonte microbiológica, o que reduz significativamente o seu custo e disponibilidade no mercado (DICKINSON, 1997). No entanto, seu uso é ainda pouco explorado e existem poucos trabalhos sistemáticos na literatura que utilizam esta enzima para alterar propriedades de barreira de micropartículas para efeito de liberação controlada.

As transglutaminases (EC 2.3.2.13; R-glutamil-peptídeo: amina  $\gamma$ -glutamil transferase) estão distribuídas extensamente em vários organismos, incluindo vertebrados, invertebrados, plantas e microorganismos, e são responsáveis por certos eventos biológicos tais como a queratinização epidermal, coagulação do sangue e regulação das membranas do eritrócito. (RAY-NENG *et al.*, 2005). Os estudos de produção da transglutaminase por microorganismos começaram recentemente, sendo a enzima obtida a partir de fermentação microbiana. Produtos alimentícios tratados com a transglutaminase microbiana apresentaram sabor, aparência e textura melhorados. Além disso, esta enzima pode aumentar a vida de prateleira e reduzir a alergenicidade de determinados alimentos (ZHU *et al.*, 1995).

Segundo Skovbjerg *et al.* (2004) (citado por GERRARD & SUTTON, 2005), a transglutaminase (E.C. 2.3.2.13; R-glutamil-peptídeo: amina  $\gamma$ -glutamil transferase) catalisa reações de acil transferência nas quais o grupo  $\lambda$ -carboxiamida de resíduos peptídicos de glutamina são os doadores acil. Dependendo da molécula receptora, três reações diferentes podem ser distinguidas (Figura 2.4). Primeiro, os grupos  $\epsilon$ -amino de resíduos de lisina podem servir como substratos para formar ligações isopeptídicas  $\epsilon$ -( $\lambda$ -glutamil)lisina intermoleculares ou intramoleculares. Na segunda reação, outras aminas primárias podem servir como receptores acil. Estas reações são utilizadas para incorporar aminas contendo açúcar, aminoácidos, etc. à cadeia protéica. A terceira reação catalisada pela transglutaminase é a deamidação da glutamina, onde as moléculas de água são usadas como receptoras resultando na conversão de glutamina em ácido glutâmico.



**Figura 2.4.** Reações catalisadas pela TG: (1) Ligações cruzadas entre resíduos de glutamina e lisina de proteínas ou peptídeos; (2) Incorporação de aminas; e (3) Deamidação (GERRARD & SUTTON, 2005).

A modificação da estrutura de proteínas pela TG pode conduzir a produtos de textura melhorada, ajudar na proteção de aminoácidos como a lisina das várias reações químicas, melhorar a elasticidade e a capacidade de ligação de água, modificar a solubilidade e as propriedades funcionais, e produzir proteínas com valor nutritivo mais elevado através de ligações cruzadas de proteínas (MATHEIS & WHITAKER, 1987). A taxa de ligações cruzadas pela TG é dependente da estrutura macromolecular de cada substrato de proteína uma vez que os resíduos reativos estão inseridos em regiões flexíveis da cadeia

polipeptídica. Outros fatores que afetam a taxa de reação são a temperatura, pH e conteúdo de cálcio (DICKINSON, 1997).

Recentemente, uma transglutaminase microbiana isolada do meio de cultura do *Streptoverticillium mobaraense* tornou-se comercialmente disponível. Ao contrário de TG de muitas outras fontes, essas transglutaminases possuem muitas características, incluindo a independência de  $\text{Ca}^{2+}$ , maior especificidade para doadores de acil, menor tamanho da molécula e taxa de reação mais elevada, as quais as tornam apropriadas para as aplicações industriais (RADEK *et al.*, 1993; ANDO *et al.*, 1989).

A enzima transglutaminase, obtida a partir de microorganismos apresenta uma faixa de ação em diferentes valores de pH (4 -9), sendo ótimo na faixa de pH 5-8 e temperatura ótima de ação de aproximadamente 50°C. O ponto isoelétrico encontra-se no pH aproximado de 8,9 (MOTOKI & SEGURO, 1998).

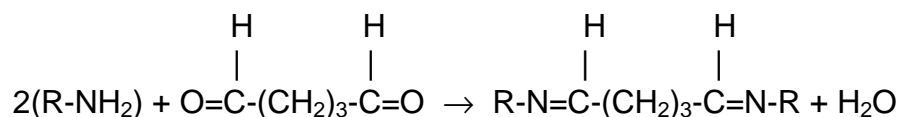
A reticulação de proteínas com transglutaminase têm despertado interesse, devido à possibilidade de melhoria das propriedades reológicas, microestrutura e interação inter e intramolecular em substratos como isolado protéico de soja, proteínas de leite e proteínas de cereais (JIANG *et al.*, 2007; MYLLÄRINEN *et al.*, 2005; MARCOA & ROSELL, 2008; HUPPERTZ & DE KRUIFF, 2007; BÖNISCH *et al.*, 2007). A ação da transglutaminase nas propriedades de filmes tem sido estudada em diferentes fontes protéicas, tais como a proteína do soro de leite (OH *et al.*, 2004), proteína da clara do ovo (LIM *et al.*, 1999), proteínas da soja (WANG *et al.*, 2007), e gelatina (LIM *et al.*, 1999; CHAMBI & GROSSO, 2006).

A concentração da enzima transglutaminase, tem influência nas características mecânicas e nas propriedades hidrofóbicas da superfície. O tratamento com concentrações baixas de enzima (4-10 U/g.ptn) conduziu ao aumento significativo na tensão de ruptura, na diminuição na elongação da superfície do filme em relação a um controle sem reticulação (TANG *et al.*, 2005; JIANG *et al.*, 2007).

### 2.6.2 Glutaraldeído

Os agentes químicos geralmente usados para formação de ligações cruzadas em proteínas são: o glutaraldeído, gliceraldeído, formaldeído e glioxal (HERNANDEZ-MUÑOZ *et al.*, 2004). Glutaraldeído, estrutura com dois aldeídos terminais é especialmente usado na reticulação de microcápsulas produzidas por coacervação utilizando como material de parede o par polimérico gelatina: goma arábica, melhorando suas propriedades de proteção (THIES, 1995). O glutaraldeído reage com os aminoácidos laterais da cadeia protéica particularmente com lisina. Seu mecanismo de ação está baseado na ativação dos grupos carboxila, que permite a ligação cruzada com o grupo  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> da lisina (FRAENKEL-CONRAT *et al.*, 1947).

Usualmente, eles são reagentes com dois lados reativos derivados de moléculas desenvolvidas para reagir com as cadeias laterais das proteínas (FEENEY & WHITAKER, 1984) e geralmente ligam-se a resíduos de lisina ou cisteína (Figura 2.5.).



**Figura 2.5.** Reação de reticulação de proteínas utilizando-se glutaraldeído.

Muitos estudos indicaram que microcápsulas reticuladas com glutaraldeído, apresentaram propriedades desejadas de liberação controlada (LEE & ROSENBERG, 1999). Geralmente a reticulação com aldeídos é a principal técnica utilizada na modificação de paredes de micropartículas por ser rápida e mais eficiente.

O grau de reticulação está diretamente associado à concentração dos reagentes. Com baixas concentrações, a ligação cruzada intramolecular é

predominante. À medida que se aumenta a concentração do glutaraldeído ocorre a formação de ligações transversais intermoleculares e conseqüentemente maior insolubilidade da proteína. No entanto, a reticulação com glutaraldeído apresenta restrições por provocar calcificação e citotoxicidade (RAY-NENG *et al.*, 2005) e por isso, esse reagente não é aprovado para uso em alimentos (SINGH *et al.*, 1989). Além disso, dúvidas têm surgido sobre a precisão com que a reatividade destes reagentes pode ser prevista (GREEN *et al.*, 2001), mas eles permanecem amplamente usados para aplicações biotecnológicas e bioquímicas.

Glutaraldeído (GLU), dimetil suberimidato (DMS), 3-dimetil-3-ditiobispropionimidato, e a mistura de GLU e DMS foram utilizados como agentes de reticulação em membranas de colágeno, nas quais o GLU induziu ao número máximo de reticulação (13) enquanto o DMS, o mínimo (7). As amostras de colágenos reticuladas com o GLU mostraram a maior redução ao inchamento e resistência à digestão da collagenase enquanto as amostras não tratadas degradaram completamente após 5 horas. Os autores justificaram os melhores resultados obtidos ao tamanho do agente reticulante em comparação aos outros agentes reticulantes utilizados. Além disso, a orientação espacial e acessibilidade dos resíduos de aminoácidos do colágeno apresentam um importante papel na densidade de reticulação e conseqüentemente nas propriedades físicas da matriz de colágeno (CHARULATA & RAJARAM 2003).

Prata (2006) observou que a reticulação química e enzimática após a produção de micropartículas por coacervação complexa contendo gelatina e goma arábica como material de parede, apresentou boa funcionalidade quanto à liberação do recheio hidrofóbico em relação a micropartículas não reticuladas. Além disso, a secagem por liofilização produziu partículas sem poros aparentes, geometria esférica e apresentando pontes sólidas entre algumas micropartículas quando o congelamento lento foi utilizado. Por outro lado, as micropartículas secas apresentaram inchamento instantâneo quando colocadas em meio aquoso, exceto as reticuladas com o glutaraldeído. Embora reticuladas, quando transglutaminase foi utilizada, as partículas obtidas com este tratamento

apresentaram acentuado grau de inchamento atingindo um tamanho pelo menos duas vezes maior que as partículas não reticuladas e re-hidratadas nos meios aquosos, apresentando taxas de liberação do recheio hidrofóbico em meios contendo tensoativos (Tween 80 ou dodecil sulfato de sódio, SDS) muito próximos ao observado para micropartículas não reticuladas. Neste estudo, micropartículas coacervadas não reticuladas foram totalmente solubilizadas no meio contendo dodecil sulfato de sódio enquanto as micropartículas reticuladas quimicamente (GLU) ou enzimaticamente (transglutaminase) permaneceram íntegras.

Em outro estudo com microcápsulas obtidas por coacervação complexa e reticuladas com glutaraldeído ou transglutaminase, foi observado que somente as micropartículas reticulada química ou enzimaticamente puderam ser secas por *spray dryer* e apresentaram integridade da parede após a reidratação, o que contribuiu para eficiência na retenção e na liberação do recheio (ALVIM, 2005). Micropartículas coacervadas não reticuladas não resistiram ao processo de secagem por atomização.

A possível substituição da reticulação química pela enzimática com aplicação na indústria de alimentos é amplamente desejável. O comportamento apresentado pelas micropartículas reticuladas enzimaticamente ou quimicamente com agentes de baixa ou isentos de toxicidade necessitam melhor conhecimento quanto à forma como o *crosslinking* ocorre e como ele determina as características de porosidade das micropartículas e conseqüente capacidade de retenção ou liberação do recheio encapsulado.

## **2.7 Liberação do material de recheio**

Uma das mais importantes propriedades da microencapsulação é a liberação controlada do material de recheio a taxas pré-estabelecidas (VERSIC, 1988).

A liberação pode ocorrer de diferentes formas, podendo-se representar quatro modelos teóricos de liberação: a) o primeiro considera a existência de um



mecanismo de disparo pela presença de uma força externa ou fatores como luz, calor, pH e degradações químicas da microcápsula; b) o segundo mecanismo assume que a parede da cápsula atua como reservatório, supondo-se que a taxa de liberação é constante; c) o terceiro modelo pressupõe a migração através da parede, mas considera um efeito adicional de liberação ocasionado por pequenos rompimentos na estrutura da microcápsula; d) o quarto modelo considera a parede como uma membrana semipermeável, seletiva a diferentes massas moleculares (THIES, 1995).

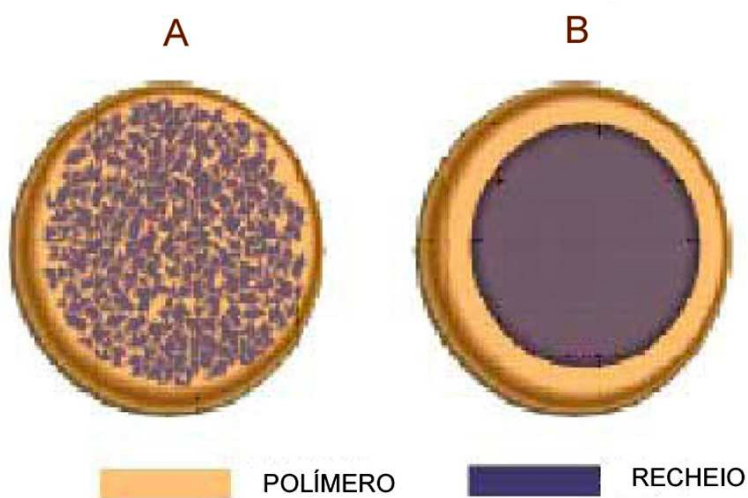
Os mecanismos de liberação do material microencapsulado variam de acordo com a natureza do agente encapsulante, podendo ocorrer por variação de temperatura e de pH extremos, solubilidade do meio, biodegradação, difusão, ruptura mecânica, permeabilidade seletiva e gradiente de concentração existente em relação ao solvente de liberação (BAKAN, 1973; BRANNON-PEPPAS, 1993). Com relação à espessura da membrana da microcápsula é importante ressaltar que pode ser manipulada de forma que a estabilidade e a permeabilidade possam ser alteradas (BAKAN, 1973). Diversos materiais utilizados como agentes encapsulantes e os prováveis mecanismos de liberação do composto ativo são apresentados na Tabela 2.2.

**Tabela 2.2.** Agentes encapsulantes e seus prováveis mecanismos de liberação.

Agentes encapsulantes	Mecanismos de liberação			
	Mecânico	Térmico	Dissolução	Químico
<i>Agentes encapsulantes hidrossolúveis</i>				
Alginato	✓		✓	
Carragena	✓		✓	
Caseinato	✓		✓	
Celulose modificada	✓		✓	
Quitosana	✓			
Gelatina	✓		✓	
Goma xantana	✓	✓		
Goma arábica	✓	✓		
Látex	✓		✓	
Polietileno-glicol	✓	✓	✓	
Oxido de polietileno	✓	✓	✓	
Polipectado	✓		✓	
Polivinil-álcool	✓		✓	
Amido	✓			
Açúcar derivatizado	✓	✓	✓	✓
<i>Agentes encapsulantes insolúveis em água</i>				
Etilcelulose	✓			
Polímero de etileno-vinil acetato	✓	✓		
Álcoois graxos	✓	✓		✓
Ácidos graxos	✓	✓		✓
Resinas de hidrocarbonetos	✓	✓		
Ftalato de hidroxipropil metilcelulose	✓			✓
Mono, di, e triacilgliceróis	✓	✓		
Parafina, ceras naturais	✓	✓		
Polianidridos	✓		✓	✓
Polibuteno	✓	✓		
Polilactide	✓		✓	✓
Polilactide-co-glycolide	✓		✓	✓
Polietileno	✓	✓		
Ésteres de polimetacrilato	✓		✓	✓
Poliortoésteres	✓		✓	✓
Ftalato de polivinil-acetato	✓			✓
Saran	✓			
Shellac	✓			✓
Cloreto de vinilideno/acrilonitrilo	✓			
Zeína	✓			

Fonte: Adaptado de Southwest Research Institute, (1991).

No processo da liberação assume-se que a distribuição do material de recheio dentro da microcápsula pode se encontrar sob duas condições. Em sistemas matriciais (Figura 2.6 A), o material de recheio é distribuído através da massa polimérica, já em sistemas reservatórios (Figura 2.6 B), o recheio concentrado é cercado pela parede da microcápsula.



**Figura 2.6.** Distribuição do material de recheio: A. sistema matricial, B. sistema reservatório.

O estado físico do polímero e do material de recheio (cristalino, amorfo, vítreo, disperso molecularmente) deve ser levado em conta no mecanismo de liberação. Por exemplo, um polímero amorfo terá coeficiente de difusão muito maior comparado ao polímero cristalino (HOMBREIRO-PEREZ *et al.*, 2003) e partículas que contêm líquidos tenderão a serem absorvidas mais rapidamente comparadas às que contêm sólidos cristalinos. A liberação do composto ativo originalmente incorporado no polímero é limitada por quatro fatores importantes. a) a quantidade inicial do óleo no polímero, b) a solubilidade do óleo no solvente de liberação, c) o coeficiente de partição do óleo no solvente e no polímero e d) barreiras difusionais (PEPPAS & BRANNON-PEPPAS, 1996).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Estudar o efeito da reticulação enzimática, com transglutaminase, e da reticulação química com glutaraldeído sobre micropartículas produzidas por coacervação complexa alternando-se a ordem de preparação dos coacervados, emulsão gelatina:recheio, mais goma arábica ou emulsão goma arábica:recheio, mais gelatina. O efeito da reticulação foi avaliado indiretamente pela capacidade de inchamento após desidratação e pela liberação de um recheio hidrofóbico. Foram também avaliados a morfologia das micropartículas e seu tamanho médio. As reticulações foram efetuadas nas micropartículas após a coacervação.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Reticular as micropartículas coacervadas utilizando glutaraldeído e transglutaminase em diferentes concentrações para tentativamente alterar características de porosidade das micropartículas.
- Avaliar o efeito dos agentes reticulantes: transglutaminase e glutaraldeído sobre as micropartículas produzidas por coacervação complexa, alternando-se a ordem de produção das micropartículas (recheio mais gelatina ou recheio mais goma arábica) na fase de preparação das emulsões.
- Caracterizar as micropartículas com ou sem reticulação quanto ao tamanho, distribuição de tamanho e morfologia, por microscopia ótica e microscopia eletrônica de varredura.
- Estudar o comportamento de inchamento das micropartículas em função do grau de reticulação das micropartículas após a re-hidratação.
- Estudar o comportamento das micropartículas em função do grau de reticulação sob a ação de diferentes meios (solução aquosa de SDS, temperatura, pH, enzimas digestivas) por microscopia ótica.

- Avaliar a liberação de timol nas micropartículas liofilizadas, com e sem reticulação em solução aquosa contendo SDS 1%.
- Avaliar a liberação da oleoresina de páprica encapsulada em micropartículas liofilizadas com e sem reticulação em condições normais e gástricas utilizando o óleo de girassol como meio de liberação.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Material**

Gelatina (origem suína, bloom 244, Gelita South America 240P/6 do tipo A conforme fornecido pelo fabricante, ponto isoelétrico característico 7-9 (POPPE, 1997)), e goma arábica (CNI-Rouen, France, ref. IRX49345) foram utilizadas como polímeros formadores de parede das micropartículas produzidas por coacervação complexa. Óleo de soja comercial Sadia tipo 1 LCG0507, oleoresina de páprica Citromax ou timol foram utilizados como material ativo. Enzima transglutaminase activa WM, doada pela Ajinomoto Internacional Indústria Ltda produzido por microorganismos *Streptovorticillium mobaraense* independente de  $\text{Ca}^{+}$ , atividade na faixa de pH 5,0 a 8,0, temperatura ótima de 50 a 55°C e atividade declarada de 100U/g de produto, segundo informações da indústria, Glutaraldeído (25% em solução aquosa) adquirido da Sigma (São Paulo, SP, Brasil). A enzima pepsina de mucosa de estômago suíno adquirido da Sigma-Aldrich, (St. Louis, MO, EUA, cod. P-7012, lote: 09K7356), atividade declarada de 2190U/mg de sólido e pancreatina de pâncreas suíno adquirida da Sigma-Aldrich, (St. Louis, MO, EUA, cod. P-1625, lote: 017K1291). Dodecil sulfato de sódio (SDS) e timol adquirido da Sigma (São Paulo, SP, Brasil).

### **4.2 Equipamentos**

Placas de agitação magnética com aquecimento IKA RH digital KT/C, pHmetro Digimed mod. AS200C, Homogenizador Ultraturrax mod. T18 marca IKA, estufa com circulação de ar Tecnal, liofilizador Edwards Pirani 501, banho-maria marca Marconi, pHmetro Digimed mod. MD20, balança analítica Ohaus mod. AS200, balança semi-analítica Marte mod. AS2000c, Homogeneizador rotativo para tubos Phoenix mod. AP22, microscópio ótico Jenaval e Nikon Eclipse E800 Tokio, Japan, microscópio eletrônico de varredura Jeol mod. JMS – T300, evaporador Balzer mod. SCD50, destilador de nitrogênio Tecnal TE-036/1, bloco digestor Tecnal, espectrofotômetro Beckman DU70, cromatógrafo a gás HP-6890

com detector seletivo de massas HP-5975 e injetor automático HP-7683, centrífuga marca Lugimac mod. LC55R e vidrarias em geral.

#### **4.3 Métodos**

##### **4.3.1 Caracterização química parcial da gelatina e goma arábica**

Para os ensaios de caracterização foi utilizada gelatina comercial suína tipo A e goma arábica.

###### **4.3.1.1 Determinação de umidade**

A umidade da gelatina e goma arábica foi determinada por secagem em estufa a 105°C por 4 horas, segundo metodologia da AOAC (1998). O resultado baseia-se na perda de massa de água ocorrida durante a secagem.

###### **4.3.1.2 Determinação de proteína**

O percentual de proteína contido na gelatina e goma arábica foi determinado através do método de KJELDAHL (AOAC, 1998), usando-se 5.55 como fator de conversão de nitrogênio para proteína.

##### **4.3.2 Produção das micropartículas por coacervação complexa**

As micropartículas foram produzidas de acordo com a metodologia descrita por Lamprecht *et al.*, (2001) e posteriormente modificada por Prata (2006) e Alvim (2005). Na obtenção das micropartículas coacervadas foram usados como materiais de parede, soluções de gelatina e goma arábica e como material de recheio uma mistura de oleoresina de páprica-óleo de soja na proporção de 1:10 (p/p).

A produção de micropartículas inclui as seguintes etapas (a) Emulsificação de 2,5 g do recheio em 100 mL de solução de gelatina (2,5%, p/p) a

50°C, 14000 rpm por 1 minuto, seguido da incorporação a 100 mL de solução de goma arábica (2,5%, p/p) a 50°C e 400 mL de água deionizada a 50°C. Na mesma etapa (emulsão) a ordem dos biopolímeros foram alternadas. (b) Redução lenta do pH da solução para o pH de coacervação dos polímeros (pH 4,0) com HCl 0,1N. (c) Resfriamento lento gradual do sistema de 50°C a 10°C – por cerca de 3 horas. O sistema de aquecimento foi desligado para permitir o abaixamento da temperatura a 25°C e banho de gelo foi usado para a baixar a temperatura do sistema a 10°C. As soluções foram preparadas com água deionizada e a agitação magnética foi mantida durante todo o processo de formação das micropartículas.

#### **4.3.3 Reação de reticulação**

Para reticulação das paredes das micropartículas coacervadas contendo oleoresina de páprica/óleo de soja foram usados glutaraldeído e transglutaminase.

##### **4.3.3.1 Reticulação química com glutaraldeído**

Para a reticulação química com glutaraldeído foi utilizada a concentração de 1 milimol por grama de proteína (mM/g.ptn) a partir de uma solução glutaraldeído (25% vol). A reação de reticulação foi realizada durante 15 horas, em temperatura ambiente sob agitação magnética. Após o período de reação das micropartículas, foi feita a remoção da solução sobrenadante e as micropartículas lavadas três vezes em água deionizada para a retirada do excesso de glutaraldeído. Finalmente a água residual foi removida por peneiramento ( $\phi$  25 $\mu$ m). Parte do material produzido foi seco por liofilização.

##### **4.3.3.2 Reticulação enzimática com transglutaminase**

Para a reticulação a enzima transglutaminase foi adicionada às micropartículas úmidas nas concentrações de 10, 20, 30, 40 e 50 unidades de atividade da enzima por grama de proteína. A quantidade de enzima foi



devidamente pesada, solubilizada com 5 mL de água deionizada e adicionada diretamente ao sistema contendo as partículas coacervadas. Todas as reticulações foram efetuadas em pH 4,0. A reação de reticulação foi realizada durante 15 horas, a temperatura ambiente sob agitação magnética. Após o período de reação foi feita a remoção da solução sobrenadante e as micropartículas lavadas três vezes com água deionizada para a retirada do excesso da enzima. Finalmente a água residual foi removida por peneiramento ( $\phi$  25 $\mu$ m).

Após a reação com glutaraldeído ou transglutaminase, seguida de lavagem, as micropartículas úmidas foram submetidas à secagem (congelamento lento para liofilização). Uma parte das micropartículas úmidas foi usada para caracterização por microscopia ótica.

#### **4.3.4 Secagem das micropartículas**

As secagens das micropartículas coacervadas com ou sem reticulação foram feitas em liofilizador Edwards Pirani 50. As condições de secagem foram: Temperatura inicial: -40 °C, Temperatura final: 25°C/2 horas, Tempo total do ciclo de secagem: 48 horas e Pressão: 0,1 mmHg.

#### **4.3.5 Caracterização das micropartículas coacervadas**

##### **4.3.5.1 Determinação de umidade**

A umidade das micropartículas coacervadas foi determinada por secagem em estufa a 105°C por 4 horas, segundo metodologia da AOAC (1998). O resultado baseia-se na perda de massa de água ocorrida na secagem.

#### **4.3.5.2 Determinação de proteína**

O percentual de proteína contida nas micropartículas coacervadas foi determinada através do método de KJELDAHL (AOAC 1998), usando-se 5,55 como fator de conversão de nitrogênio para proteína.

#### **4.3.5.3 Determinação do diâmetro médio e distribuição de tamanho das micropartículas**

A determinação de tamanho médio e a distribuição de tamanho das micropartículas foram feitas por microscopia ótica utilizando-se um microscópio ótico (NIKON - eclipse E800, Tokyo Japan) com captação de imagens através de uma câmera digital controlada pelo programa Image-pro plus 6.0, utilizando objetivas de 2x.

As fotos digitalizadas de 500 micropartículas para cada amostra foram processadas. As médias, desvio padrão e os gráficos destas medidas foram feitos com auxílio do programa Microcal Origin pro 8.0 (Microcal Software, Inc., MA, USA).

#### **4.3.5.4 Microscopia óptica e eletrônica de varredura**

A observação da morfologia e microestrutura das micropartículas foram feitas por microscopia ótica (MO) e por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

A morfologia das micropartículas foi observada pelo microscópio ótico NIKON (Eclipse E800, Tokyo Japan) com captação de imagens através de uma câmera digital controlada pelo programa Image-pro plus 6.0, utilizando objetivas de 10x.

Micropartículas liofilizadas foram observadas por MEV, as amostras foram fixadas em pequenos pedaços de fita adesiva metálica de cobre dupla face, presos em *stubs* de alumínio de 1 cm de diâmetro por 1cm de altura. Esses conjuntos foram recobertos por uma camada de ouro em um evaporador Sputter

Balzers SDC050 (Baltec, Lichtentein) com corrente de 40 mA por 180 segundos. As imagens foram observadas posteriormente em microscópio eletrônico de varredura Jeol JMS-T330 (Tokyo, Japan) com aceleração de voltagem de 10 kV e aumentos de 150x, 250x e 500x.

#### **4.3.6 Resistência das micropartículas coacervadas a diversos tratamentos**

##### **4.3.6.1 Inchamento das micropartículas em água após secagem por liofilização**

O inchamento das micropartículas foi avaliado por microscopia ótica através da observação da alteração do diâmetro médio das micropartículas secas após suspensão em água deionizada por 1 minuto, 1 hora e 24 horas. Utilizou-se o microscópio ótico (NIKON - eclipse E800, Tokyo Japan) com captação de imagens através de uma câmera digital controlada pelo programa Image-pro plus 6.0, utilizando objetivas de 2x. As fotos digitalizadas de 500 micropartículas para cada amostra analisada foram processadas. As médias, desvio padrão e os gráficos destas medidas foram feitos com auxílio do programa Microcal Origin pro 8.0 (Microcal Software, Inc., MA, USA).

##### **4.3.6.2 Resistência das micropartículas em soluções contendo dodecil sulfato de sódio (2% e 5%)**

As amostras de micropartículas úmidas e solução (2% e 5%) de SDS, na proporção de 1:2 (p/p) foram pesadas e transferidas para tubos de ensaio. Os tubos foram agitados por 15 segundos e o tempo da manutenção das micropartículas nos meios foi de 1 hora a temperatura de ambiente. Após o tratamento as amostras foram observadas conforme descrito no item 4.3.6.1.

#### **4.3.6.3 Avaliação da resistência das micropartículas a diferentes temperaturas por microscopia ótica**

Para avaliar o efeito do grau de reticulação na manutenção da integridade das micropartículas coacervadas, amostras de micropartículas úmidas em água destilada na proporção 1:3 (p/p) foram transferidas para tubos de ensaio e submetidas a tratamento térmico a 65°C e 97°C por 15 minutos. Após o tratamento as micropartículas foram observadas utilizando-se microscópio óptico (Jenaval, Carl Zeiss, Germany) com objetiva de 12,5x e optovar 1,0x, sem projetiva acoplada à câmera (Hitachi 45-752, Tokyo, Japan).

#### **4.3.6.4 Resistência das micropartículas as diferentes condições de pH**

Micropartículas coacervadas liofilizadas reticuladas e sem reticulação foram pesadas (100 mg) para avaliar o efeito do grau de reticulação na manutenção da integridade da parede, adicionando-se 1 mL de solução aquosa ajustada para valores de pH 1, 2 e 7 com HCl 0,1N a temperatura de ambiente por 1 hora. Após o tratamento as imagens foram observadas em microscópio óptico (Jenaval, Carl Zeiss, Germany) com objetiva de 12,5x e optovar 1,0x, sem projetiva acoplada à câmera (Hitachi 45-752, Tokyo, Japan).

#### **4.3.6.5 Resistência das micropartículas à ação das enzimas digestivas (pepsina e pancreatina)**

Micropartículas coacervadas, reticuladas e liofilizadas foram submetidas à ação das enzimas pepsina e pancreatina de acordo com a metodologia descrita por Lonnerdal *et al.* (1993) (citado por BERNEJO *et al.*, 2002 e INTAWONGSE & DEAN, 2006). Foram pesadas 159,4 mg de micropartículas reticuladas e sem reticular (50 mg de proteína), adicionando-se 1 mL de solução de pepsina (2,65U/mg de proteína) em HCl 0,1N, com ajuste do pH para 1,2. Amostras foram incubadas por 1 e 2 horas em banho-maria a 37°C com agitação. Após duas horas o sistema foi neutralizado com NaHCO<sub>3</sub> 1,5 N a pH 7,0. Posteriormente foi

adicionado 1 mL de solução de pancreatina (0,15 mg/mL em  $\text{NaHCO}_3$  0,1N) e efetuada nova incubação por 4 horas em banho-maria a 37°C com agitação. Após 1 e 2 horas da ação da pepsina, e após 4 horas da ação da pancreatina foi usada banho de gelo para parar a ação das enzimas. As amostras foram observadas em microscópio ótico conforme descrito anteriormente (item 4.3.6.4).

#### **4.3.7 Estudo da eficiência da reticulação**

##### **4.3.7.1 Liberação do material de recheio contendo timol**

A liberação do material de recheio das micropartículas coacervadas, liofilizadas e reticuladas contendo timol (50 mg/grama de micropartículas secas) foi determinada pela adição de uma massa de micropartículas liofilizadas ( $500 \pm 0,1$  mg) e adicionando-se 100 mL de solução de SDS 1%. As amostras foram colocadas em um suporte cilíndrico (Fig. 4.1) com paredes em aço inox (área de transferência de  $220 \text{ cm}^2$ , diâmetro da tela de  $25 \mu\text{m}$ ). O suporte foi ajustado a um béquer de 400 mL e fixado em um banho Dubnoff (Marconi, Piracicaba, Brasil). Os béqueres foram mantidos em agitação a temperatura de 25°C constante durante o experimento. Alíquotas de 5 mL foram retiradas do béquer a 30, 60, 120, 180, 240 minutos, com reposição de solvente. Foi utilizado algodão dentro da ponta da pipeta para remover o solvente do sistema de liberação. A determinação do timol na solução de SDS foi realizada em um cromatógrafo a gás HP-6890 acoplado a detector seletivo de massas HP-5975, nas seguintes condições cromatográficas: Coluna capilar: HP-5MS (30 m x 0,25 mm x  $0,25 \mu\text{m}$ ), temperaturas: injetor = 220°C, coluna = 60°C, 3°C/min, 240°C, detector = 250°C, volume injetado: 1,0  $\mu\text{L}$ , vazão do gás de arraste (He):  $1,0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ .

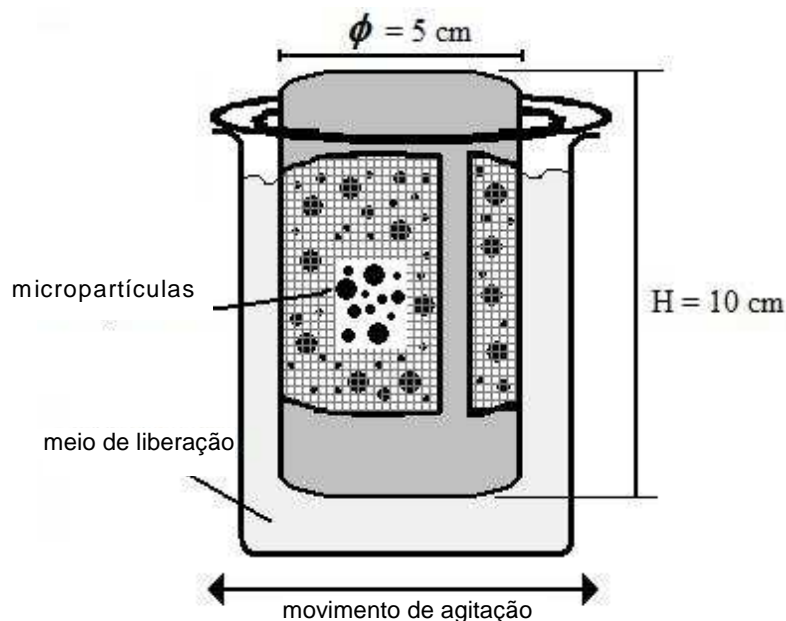
A quantidade inicial (tempo = 0) de timol presente nas micropartículas foi determinada após solubilização de 200 mg de micropartículas reticuladas e sem reticulação, adicionando 1 mL de solução de pancreatina (0,30 mg/mL em  $\text{NaHCO}_3$  0,1M, pH 7) e incubada por 30 minutos em banho-maria a 37°C. Após, esse tempo foram adicionados 9 mL de solução de SDS 1%. O conteúdo dos

tubos foi filtrado em papel filtro e o sobrenadante quantificado cromatograficamente nas condições descritas anteriormente.

Para quantificação de timol liberado foi feita uma curva padrão pesando analiticamente cerca de 20,0 mg de padrão de timol em balão volumétrico de 25 mL, adicionando-se 15 mL de metanol e agitando-se até completa dissolução. Completou-se o volume com metanol (solução A = 800  $\mu\text{g/mL}$ ). A partir desta solução, foram preparados padrões na faixa de concentração de 80 – 560  $\mu\text{g/mL}$  em balão volumétrico de 10 mL.

Para a determinação da quantidade inicial (tempo = 0) de timol presente nas micropartículas, foram adicionados em um balão volumétrico de 5 mL, 2,0 mL de solução amostra, 1,0 mL de solução de padrão interno (dibutilftalato) e o volume completado com água deionizada.

As curvas de liberação foram expressas como porcentagem liberada do timol em relação à quantidade inicial deste composto presente na massa de micropartículas utilizadas versus o tempo, em minutos.



**Figura 4.1.** Sistema de liberação elaborado para o estudo com micropartículas contendo timol.

#### **4.3.7.2 Liberação de oleoresina de páprica de micropartículas coacervadas em óleo de girassol**

A liberação da mistura oleoresina de páprica-óleo de soja (1:10) das micropartículas coacervadas, liofilizadas, reticuladas e sem reticulação foi determinada pela adição de uma massa de micropartículas secas (100 mg) adicionando-se 20 mL de óleo de girassol. As amostras foram colocadas em tubos com tampa, vedadas com o auxílio de fita veda roscas. Para cada tempo foram preparadas três replicatas. Os tubos foram protegidos com papel alumínio para evitar possíveis degradações dos compostos de cor da oleoresina e foram mantidos sob agitação a 25 rpm a temperatura ambiente (25°C). O experimento foi efetuado sem reposição de solvente, retirando-se amostras a 4, 8, 12 e 24 horas. O conteúdo de cada tubo foi filtrado em lã de vidro e o filtrado centrifugado por 10 minutos a 3500 rpm, determinando-se o conteúdo de oleoresina liberada em espectrofotômetro a 460 nm.

Para quantificação da oleoresina liberada foi construída uma curva padrão da mistura oleoresina de páprica-óleo de soja em óleo de girassol. A absorbância das misturas diluídas em serie foram medidas a 460 nm.

Para a determinação da quantidade inicial (tempo = 0) da oleoresina presente nas micropartículas, amostras de 100 mg de micropartículas foram solubilizadas adicionando-se 1 mL de solução de pancreatina (0,30 mg/mL em NaHCO<sub>3</sub> 0,1N, pH 7). A suspensão foi incubada por 30 minutos em banho-maria a 37°C. Após a digestão e resfriamento a temperatura ambiente foi adicionado 20 mL de óleo de girassol e o sistema mantido sob agitação a 25 rpm por 1 hora. O conteúdo dos tubos foi filtrado, centrifugado e a absorbância do sobrenadante medida em espectrofotômetro como descrito acima.

#### **4.3.7.3 Efeito da reticulação e do tratamento das micropartículas em condições gástricas (pH ácido, pepsina) na liberação da oleoresina de páprica**

Foram pesadas 100 mg de micropartículas reticuladas e sem reticulação secas (31,4 mg de proteína), adicionando 1 mL de água deionizada para re-hidratação por 15 minutos. Após a re-hidratação foi adicionada 1 mL de solução de pepsina (2,65U/mg de proteína) em HCl 0,1N para ajustar o pH da solução para 1,2. Os sistemas foram incubados por 2 horas em banho-maria a 37°C com agitação. Após o resfriamento foram adicionados 20 mL de óleo de girassol e os tubos agitados de forma intensa e manual por três minutos. O conteúdo de cada tubo foi filtrado, centrifugado e a quantidade de oleoresina determinada como descrito no item 4.3.7.2. Para este experimento foram avaliadas as seguintes amostras: micropartículas sem reticulação, micropartículas reticuladas com transglutaminase (50U/g.ptn) e micropartículas reticuladas com glutaraldeído. Os dois sistemas a) oleoresina de páprica-óleo de soja emulsificados com solução de gelatina e posterior adição de solução de goma arábica e b) oleoresina de páprica-óleo de soja emulsificados com solução de goma arábica e posterior adição de solução de gelatina foram avaliados. A avaliação foi feita em triplicata para cada amostra.

As quantidades de oleoresina determinadas no tempo zero (quantidade efetiva presente nas micropartículas) foram utilizadas para calcular a eficiência de encapsulação. A eficiência de encapsulação foi determinada pela relação:

$$EE(\%) = \frac{\text{Oleoresina no tempo zero(mg)} / \text{micropartículas em base seca(mg)}}{\text{Oleoresina utilizada inicialmente(mg)} / \text{massa seca inicial(mg)}}$$

#### **4.3.8 Análise estatística**

O cálculo da análise de variância ANOVA foi realizado pelo programa estatístico SAS e as diferenças entre os valores das médias foram avaliadas de acordo com o teste TUKEY no intervalo de 95% de confiança.



## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Caracterização das micropartículas coacervadas

Micropartículas obtidas por coacervação complexa foram produzidas considerando condições de processamento e de composição previamente avaliadas em trabalhos anteriores (ALVIM, 2005; PRATA, 2006) e apresentadas na Tabela 5.1. Estas condições foram escolhidas de forma a obter micropartículas integras, esféricas, multinucleadas, apresentando distribuição de tamanho unimodal e contendo quantidade razoável (50% peso/peso do material de parede) de material de recheio hidrofóbico composto de oleoresina de páprica-óleo de soja (1:10).

**Tabela 5.1. Condições de reticulação química e enzimática de micropartículas coacervadas contendo como recheio oleoresina de páprica-óleo de soja**

	Glutaraldeído	Transglutaminase
Concentração	1 mM/g.ptn	10, 20, 30, 40 e 50U/g.ptn
Tempo de reação	15 horas	15 horas
Temperatura	25°C	25°C

O objetivo principal do presente trabalho foi estudar de forma mais aprofundada a intensidade de reticulação das micropartículas obtidas utilizando a enzima transglutaminase em substituição a utilização de um reticulante químico, o glutaraldeído, que é muito eficiente, porém, tóxico e portanto apresenta restrições com relação, à utilização em alimentos. Trabalho similar com ambos agentes, químico e enzimático foi investigada anteriormente, tendo sido possível observar que a reticulação propiciou melhoras na resistência física e na porosidade das micropartículas, permitindo sua secagem por *spray dryer*, onde micropartículas

não reticuladas não suportaram o processo drástico de retirada de água e foram rompidas (ALVIM, 2005). Em outro estudo, a melhora da resistência física devido à reticulação foi verificada utilizando-se soluções de dodecil sulfato de sódio e observando-se que as micropartículas reticuladas, independente do agente químico ou enzimático, mantiveram-se íntegras enquanto micropartículas sem reticulação se desfaziam em contato com o meio rapidamente (PRATA *et al.*, 2008). No entanto, em ambos os trabalhos, as propriedades de porosidade das micropartículas reticuladas com a enzima não foram melhoradas de maneira a atingir o efeito mais eficiente obtido, quando o reticulante químico foi utilizado. A falta de eficiência foi atribuída a baixa relação enzima:substrato, gerando portanto a presente investigação onde quantidades maiores de enzima foram utilizadas. A porosidade da parede das micropartículas obtidas por coacervação complexa pode ser modificada através da formação de ligações cruzadas intra ou intermoleculares com o uso de agentes reticulantes, mostrando-se mais estável a degradação térmica, solvente orgânicos e ataques proteolíticos (LAMPRECHT *et al.*, 2000).

Um segundo objetivo estudado, pouco abordado na literatura, foi avaliar se a ordem de preparação da emulsão contendo um dos dois hidrocolóides e o material hidrofóbico de recheio poderia ter efeito sobre o grau de reticulação. Desta forma na primeira preparação, gelatina foi emulsionada com o material de recheio com posterior adição de goma arábica para produzir a interação eletrostática seguida da separação de fases e produção das micropartículas. Na segunda preparação a ordem foi invertida. Na literatura, a grande maioria dos trabalhos inicia a preparação emulsionando o material de recheio juntamente com a gelatina e posterior adição de goma arábica (THIES, 1995; LAMPRECHT *et al.*, 2001), ou a emulsão é preparada com a adição conjunta de todos os componentes simultaneamente antes do preparo da mesma (DONG *et al.*, 2008). Poucos trabalhos utilizaram a goma arábica inicialmente para produzir a emulsão (XING *et al.*, 2004). A hipótese do presente estudo, é que a ordem de preparo da emulsão pode permitir que a proteína permaneça mais externa na parede de hidrocolóides

formadora das micropartículas e portanto mais acessível a reticulação pelos agentes utilizados.

A coacervação complexa ocorre em condições extremamente específicas de balaço de cargas produzidas entre outros fatores, pelo ajuste fino do pH. Lamprecht et al (2000) realizaram um trabalho aprofundado sobre a forma de interação das micropartículas utilizando microscopia confocal. Os autores, utilizando corantes fluorescentes diferentes associados covalentemente à gelatina e a goma arábica, observaram uma distribuição homogênea de ambos os polímeros, sem que um deles ficasse predominantemente localizado próximo ao recheio ou próximo à parte externa da micropartícula. Os materiais de parede apresentaram-se totalmente distribuídos por toda a extensão da parede. Independente da ordem de preparação das emulsões as micropartículas foram formadas facilmente e aparentemente sem diferenças morfológicas quanto à esfericidade das mesmas e quanto à efetividade da encapsulação de recheio.

Inicialmente o conteúdo de proteínas da gelatina e da goma arábica foi determinado e atingiram  $89,9 \pm 0,3\%$  e  $2,78 \pm 0,18\%$  de proteína respectivamente apresentando teores de umidade de 10,9% e 10,1% para a gelatina e a goma arábica respectivamente. A goma arábica é amplamente utilizada como emulsificante especialmente na encapsulação de *flavors* constituídos por óleos essenciais especialmente utilizando secagem por *spray dryer* para posterior uso em diversos tipos de alimentos. Se atribue a capacidade emulsificante à fração protéica presente na goma arábica e em geral a estabilidade da emulsão aumenta com o aumento da massa molar e com o conteúdo de proteínas presentes na goma arábica (RANDALL *et al.*, 1988). A goma arábica é um polissacarídeo carregado negativamente acima do pH correspondente ao  $pK_a$  da mesma (pH~2,2), apresentando supressão da dissociação em valores de pH inferiores ao valor do  $pK_a$  (BURGESS & CARLESS, 1984). A composição de aminoácidos da parte protéica da goma arábica contem resíduos de lisina os quais poderiam participar na formação de *cross-links* catalizados pelos agentes de reticulação dependendo da orientação da glicoproteína presente na goma arábica (OSMAN *et al.*, 1993).

Em um trabalho recente foi estudada a possibilidade de ocorrência de reticulação entre a goma arábica e caseinato de sódio utilizando transglutaminase, medindo a variação da massa molecular utilizando cromatografia de permeação em gel após a reação dos sistemas com a enzima (FLANAGAN & SINGH, 2006). A ausência de mudanças nos tempos de eluição dos principais componentes da goma arábica após incubação com a enzima indicou que o *cross-linking* não ocorre entre as moléculas de goma arábica. Efeito contrário foi observado quando a mistura goma arábica-caseinato foram conjuntamente submetidas a ação enzimática. Os autores ainda observaram através dos perfis de eluição que o efeito mais provável é a formação de grandes agregados de caseinato de sódio ligados a uma ou mais moléculas de goma arábica, sendo pouco provável a associação de moléculas individuais de caseína-goma arábica.

Micropartículas sem reticulação e reticuladas em diferentes intensidades (10-50U/g.ptn para transglutaminase e 1mM glutaraldeído/g.ptn) foram posteriormente secas por liofilização. A secagem de micropartículas obtidas por coacervação complexa ou por geleificação iônica visa aumentar a vida útil das mesmas que originalmente contém uma grande quantidade de água. Além disto, a secagem possibilita ampliar a faixa de possibilidades de aplicações dessas micropartículas (BURGESS & PONSART, 1998; MUKAI-CORRÊA, 2003). O conteúdo de proteínas em base seca variou de 30,1 a 32,6% sem diferença significativa entre os diferentes níveis de agente reticulante (enzima ou glutaraldeído) e também sem diferença significativa devido à ordem em que as emulsões foram produzidas. Esses resultados eram esperados considerando-se que ambos os sistemas produziram separação de fases e fácil formação de micropartículas.

O aspecto visual dos sistemas após a formação das micropartículas mostrou que as soluções ficaram límpidas e transparentes indicando a ausência de hidrocolóides ou recheio na solução aquosa. A falta de diferença significativa também era esperada considerando que mesmo nas maiores concentrações enzimáticas utilizadas a quantidade de proteína de fonte enzimática possível de

ser incorporada nas micropartículas em termos de massa é muito pequena. Adicionalmente acredita-se que devido à alta solubilidade aquosa da enzima transglutaminase, ela após promover a reticulação, permanece na solução aquosa e portanto poderia ser facilmente removida do sistema quando as mesmas foram peneiradas ( $\phi 25\mu\text{m}$ ) no passo prévio ao congelamento anterior a liofilização. A umidade das micropartículas secas variou entre 2,21 a 2,66% sem diferenças significativas devido aos tratamentos com diferentes quantidades de enzima ou a ordem de preparação das emulsões.

## **5.2 Determinação do diâmetro médio das micropartículas coacervadas**

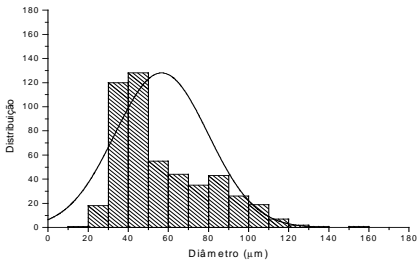
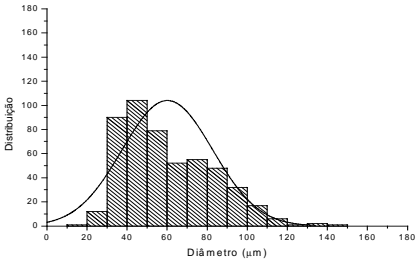
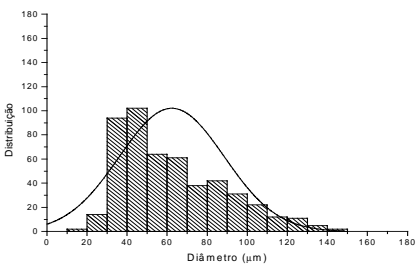
Os diâmetros médios das micropartículas coacervadas úmidas contendo oleoresina de páprica-óleo de soja (1:10) e submetidas a reticulação com transglutaminase e glutaraldeído, foram determinados por microscopia ótica e são apresentados nas Tabelas 5.2, para micropartículas produzidas com emulsão preparada com gelatina/oleoresina de páprica-óleo de soja e na Tabela 5.3, com as micropartículas produzidas com a emulsão preparada com goma arábica/oleoresina de páprica-óleo de soja.

O tamanho das micropartículas produzidas por coacervação complexa, utilizando como par polimérico gelatina e goma arábica é afetado por muitos parâmetros, tais como taxa de agitação, viscosidade da solução, recheio/polímero, quantidade de água, etc. O tamanho das microcápsulas é da ordem de várias dezenas a várias centenas de micron (INOUE *et al.*, 2002).

Para os dois sistemas avaliados (gelatina/oleoresina de páprica-óleo de soja e goma arábica/oleoresina de páprica-óleo de soja) as micropartículas sem reticulação apresentaram diâmetros médios um pouco menores que os observados para micropartículas reticuladas com transglutaminase e glutaraldeído (Tabelas 5.2 e 5.3). As micropartículas reticuladas com concentrações diferentes de transglutaminase não apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre elas. As reticuladas com glutaraldeído produziram micropartículas com diâmetros

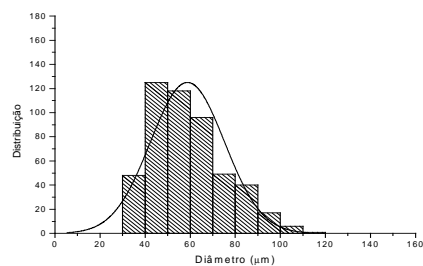
médios um pouco maiores que os observados para micropartículas sem reticulação e as reticuladas com transglutaminase. Como pode também ser observado a forma de preparo das emulsões, com gelatina e goma arábica emulsionadas ao recheio hidrofóbico, não produziram diferenças em relação ao diâmetro médio e sua distribuição.

**Tabela 5.2.** Diâmetros médios ( $\mu\text{m}$ ), respectivos desvios padrões e distribuição de tamanho das micropartículas coacervadas úmidas da emulsão gelatina/oleoresina de páprica-óleo de soja.

Tratamento	Diâmetro médio ( $\mu\text{m}$ )	Distribuição de tamanho
GEMSR	$56,60 \pm 23,20^b$	
GEMR10U	$60,11 \pm 22,64^{ab}$	
GEMR20U	$62,33 \pm 26,23^{ab}$	

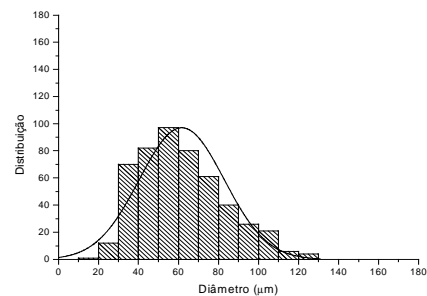
GEMR30U

$58,80 \pm 16,42^b$



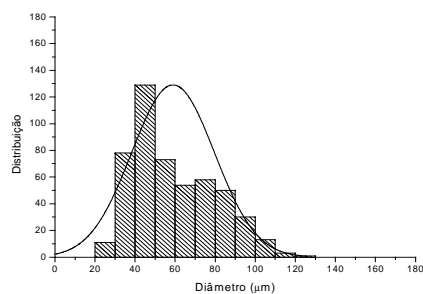
GEMR40U

$61,63 \pm 21,23^{ab}$



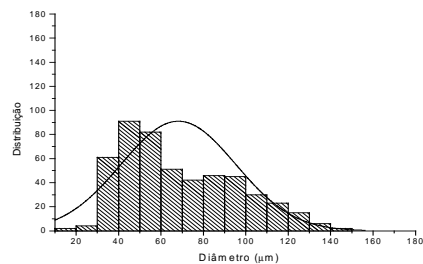
GEMR50U

$58,95 \pm 20,69^{ab}$



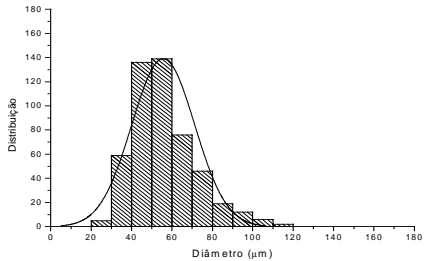
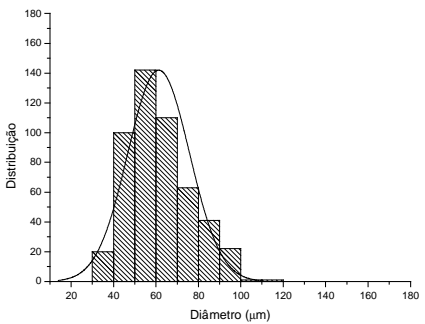
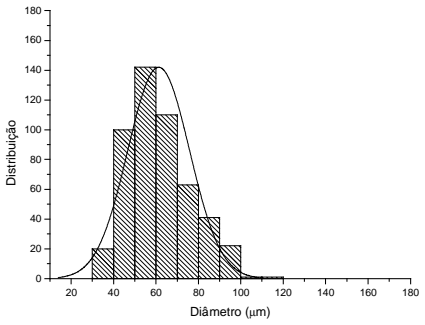
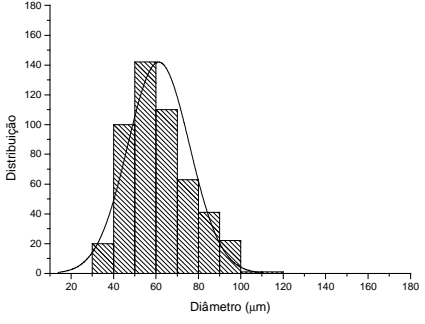
GEGLU

$68,18 \pm 27,05^a$



Nota: letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as médias obtidas através do teste Tukey.

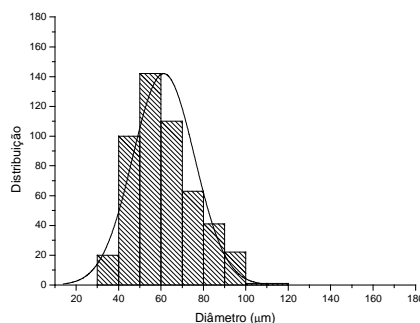
**Tabela 5.3.** Diâmetros médios ( $\mu\text{m}$ ), respectivos desvios padrões e distribuição de tamanho das micropartículas coacervadas úmidas da emulsão goma arábica/oleoresina de páprica-óleo de soja.

Tratamento	Diâmetro médio ( $\mu\text{m}$ )	Distribuição de tamanho
GAMSR	$55,66 \pm 23,20^b$	
GAMR10U	$60,94 \pm 20,05^b$	
GAMR20U	$56,57 \pm 16,20^b$	
GAMR30U	$58,56 \pm 23,77^b$	



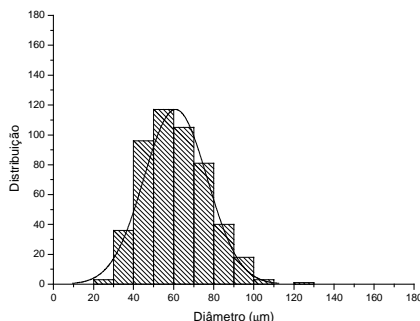
GAMR4U

$61,26 \pm 14,56^b$



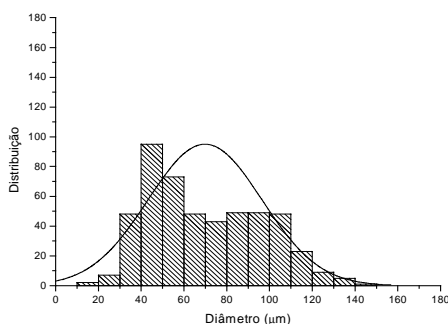
GAMR50U

$60,92 \pm 15,80^b$



GAGLU

$69,84 \pm 26,66^a$



Nota: letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as médias obtidas através do teste Tukey.

Wang & Zhao (2008) produziram microcápsulas por coacervação complexa, utilizando como material formador de parede gelatina e goma arábica; os autores reportaram que a média e distribuição do tamanho das microcápsulas foram calculadas a partir dos resultados de microscopia óptica. O diâmetro médio das micropartículas obtido foi 60  $\mu\text{m}$  e similares aos obtidos no presente trabalho.

Pode-se observar nos histogramas apresentados (Tabelas 5.2 e 5.3) que existe uma variabilidade de tamanho inerente ao método de produção das

micropartículas. A distribuição gerada pelos diâmetros medidos e em vários tratamentos é unimodal e se aproxima da distribuição normal.

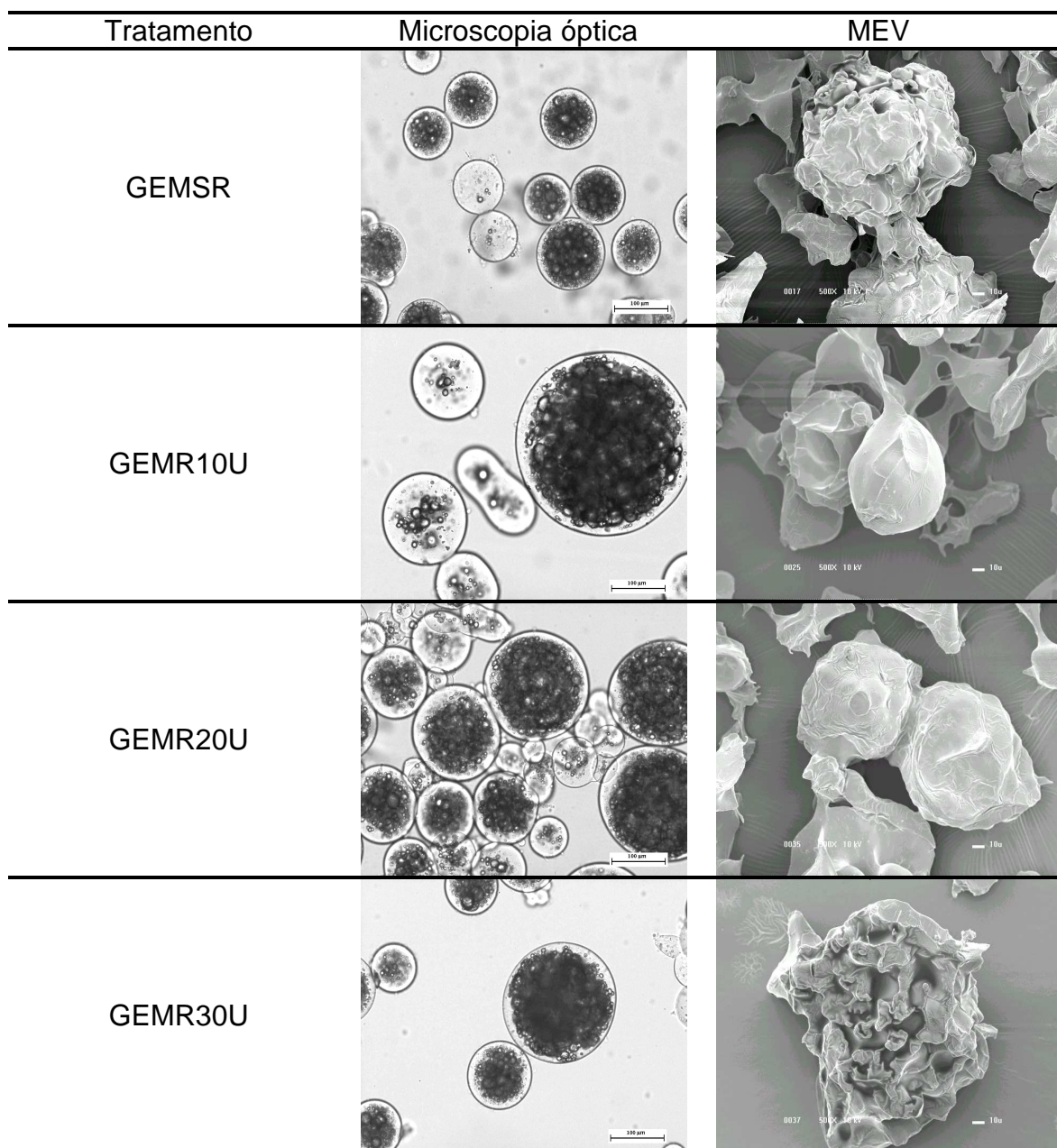
### **5.3 Morfologia e microestrutura das micropartículas coacervadas úmidas e liofilizadas**

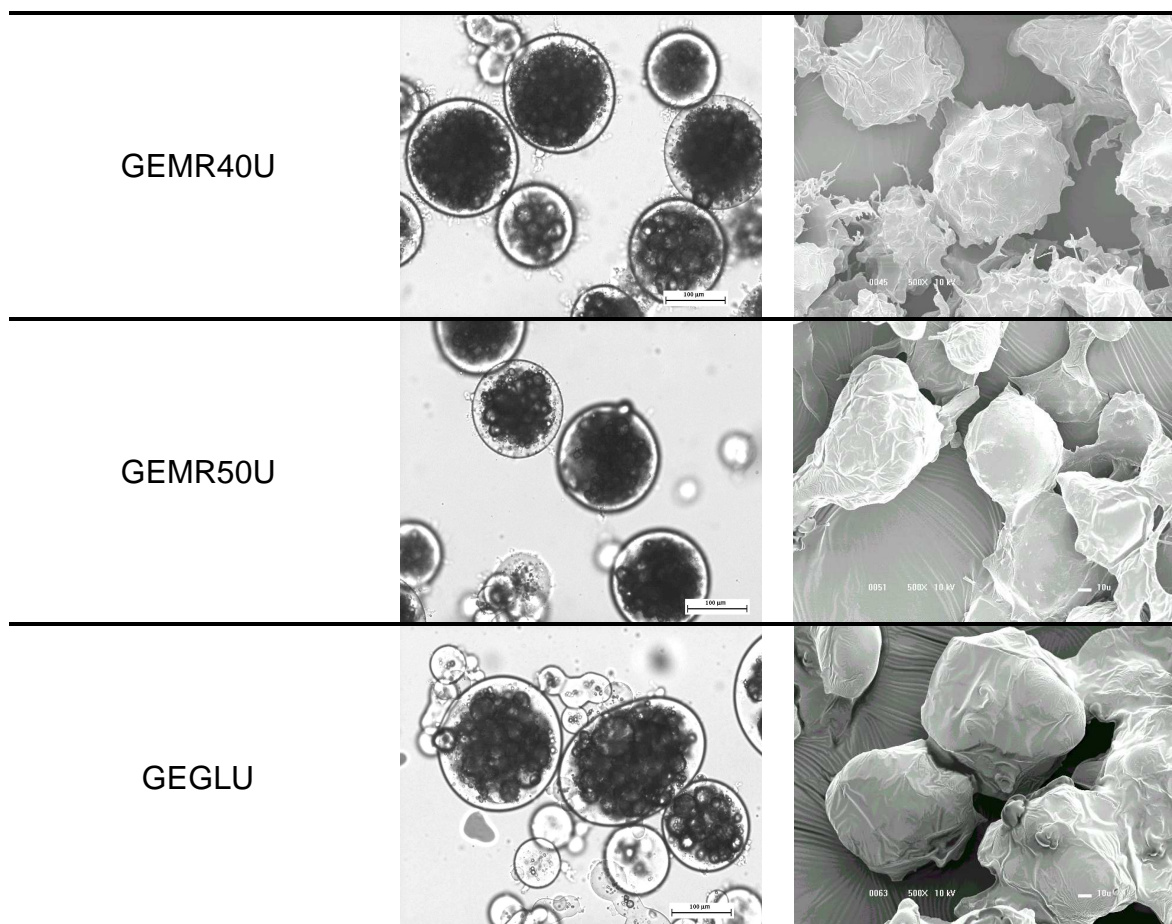
As imagens captadas por microscopia ótica e microscopia eletrônica de varredura permitem observar detalhes da morfologia e da microestrutura das micropartículas. As microscopias óticas e de varredura têm sido empregadas na obtenção de informações relativas a forma, ao tamanho em alguns casos, a distribuição do recheio no interior das micropartículas.

As Figuras 5.1. (gelatina/oleoresina de páprica-óleo de soja) e 5.2. (goma arábica/oleoresina de páprica-óleo de soja) apresentam as imagens obtidas por microscopia ótica das micropartículas úmidas e de microscopia eletrônica de varredura das micropartículas coacervadas secas, contendo oleoresina de páprica-óleo de soja, sem reticulação e reticuladas com transglutaminase ou com glutaraldeído.

A partir das observações feitas por microscopia ótica é possível perceber que, de forma geral as micropartículas apresentam formatos esféricos, com parede definida, distribuição multinuclear do material do recheio, porém homogeneamente distribuídas em toda a extensão das micropartículas. Variações de tamanho, como observado na medida distribuição de tamanho, podem ser observados nas captações óticas. Nas mesmas figuras (coluna 3) apresentam-se as imagens de microscopia eletrônica de varredura das micropartículas após a liofilização. As micropartículas mantêm a esfericidade, porém é possível observar a formação de pontes sólidas decorrentes do processo de secagem conforme observado anteriormente. Algumas arestas podem ser observadas na superfície das micropartículas. Apesar das pontes sólidas, a parede se apresenta contínua e aparentemente homogênea e sem furos ou quebraduras (ALVIM, 2005; PRATA, 2006).

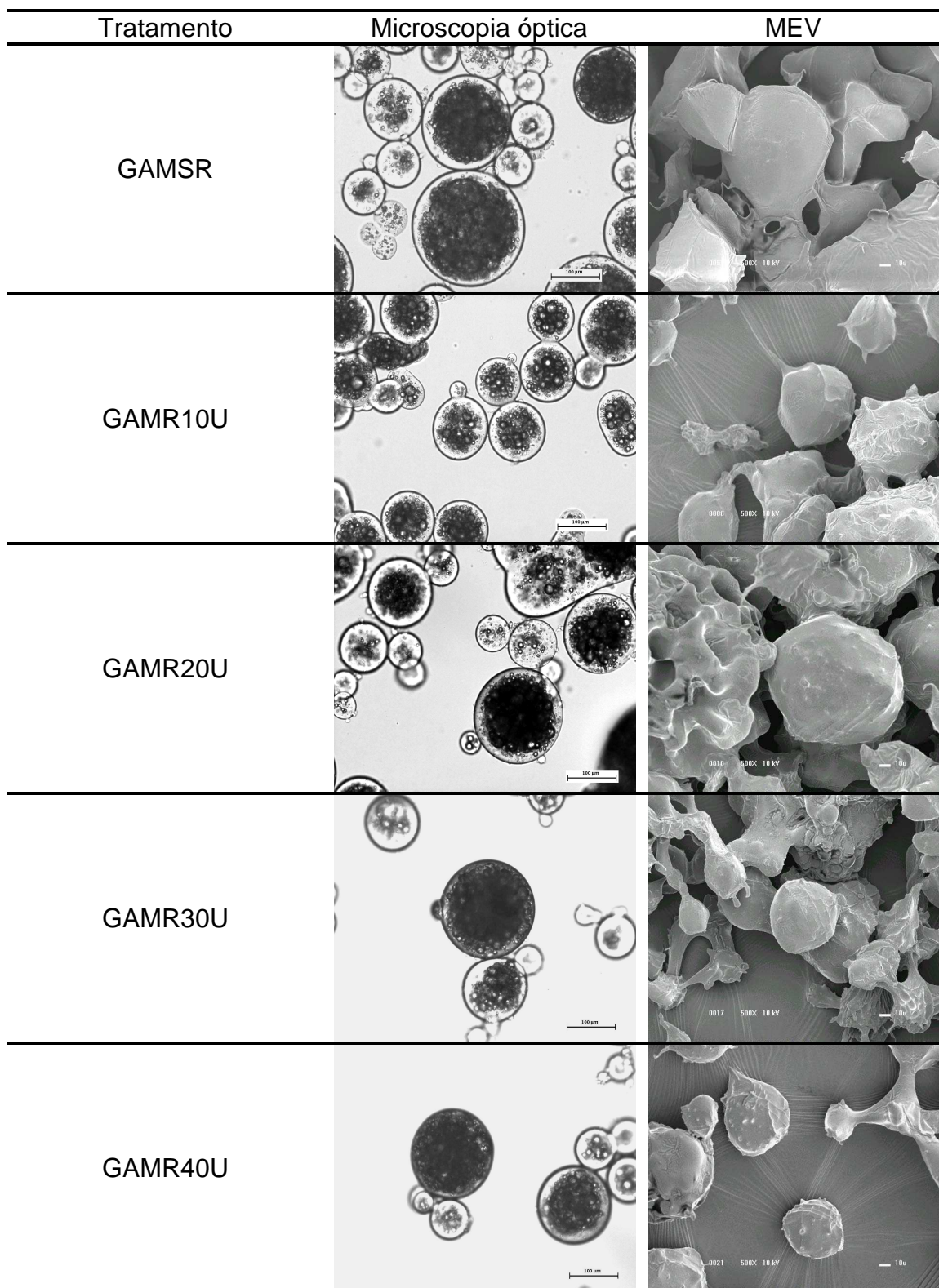
Como observado na medida dos diâmetros médios e na distribuição não foram observadas diferenças morfológicas devido à ordem de preparo das emulsões ou as diferentes intensidades ou agentes reticulantes utilizados.

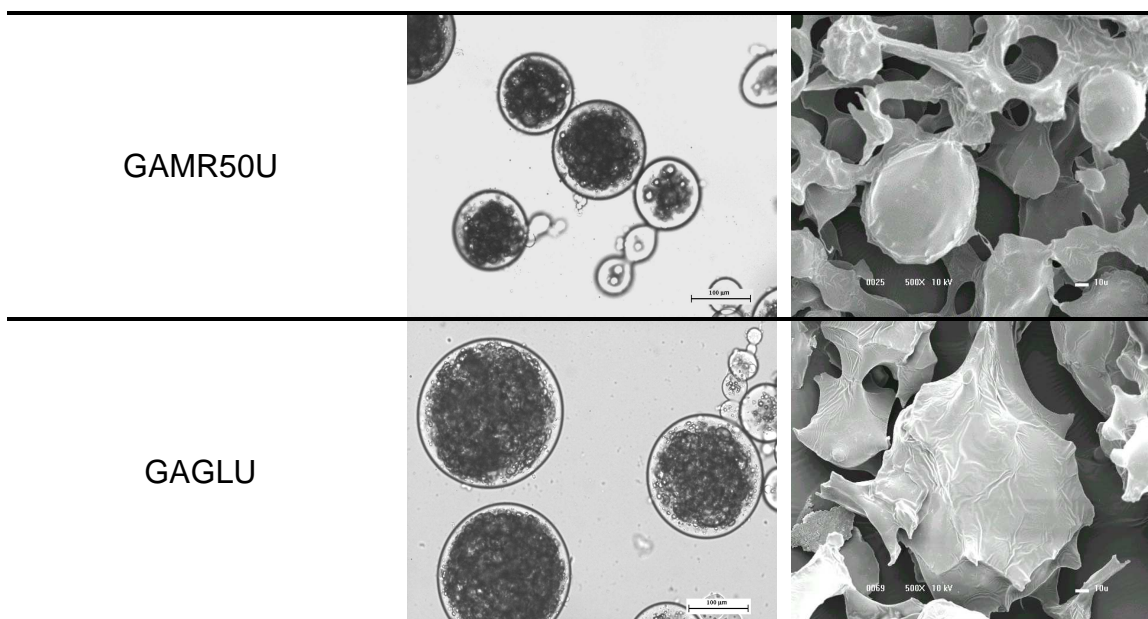




**Figura 5.1.** Imagens obtidas por microscopia ótica (coluna 2) e por microscopia eletrônica de varredura (coluna 3) de micropartículas coacervadas úmidas e liofilizadas: sem reticulação e reticuladas com diferentes concentrações de transglutaminase (10-50U/g.ptn) e reticuladas com glutaraldeído (1mM/g.ptn). Barras Microscopia ótica = 100 $\mu$ m e MEV=10 $\mu$ m da emulsão gelatina/oleoresina de páprica-óleo de soja.







**Figura 5.2.** Imagens obtidas por microscopia ótica (coluna 2) e por microscopia eletrônica de varredura (coluna 3) de micropartículas coacervadas úmidas e liofilizadas: sem reticulação e reticuladas com diferentes concentrações de transglutaminase (10-50U/g.ptn) e reticuladas com glutaraldeído (1mM/g.ptn). Barras Microscopia ótica = 100 $\mu$ m e MEV=10 $\mu$ m, da emulsão goma arábica /oleoresina de páprica-óleo de soja

#### **5.4 Resistência das micropartículas coacervadas a diversos tratamentos**

Micropartículas obtidas por coacervação complexa apresentam algumas vantagens em relação a outros processos de obtenção de micropartículas. A principal é a alta capacidade de encapsulação apresentada por este tipo de processo. Adicionalmente no processo, parte-se de soluções de hidrocolóides muito solúveis em água e obtém-se posteriormente a interação eletrostática e separação de fases, micropartículas insolúveis em situações controladas de pH e força iônica. Por outro lado as micropartículas obtidas por coacervação complexa são frágeis e podem ser rompidas facilmente em algumas situações. Para contornar este problema, a literatura propõe o uso da reticulação, especificamente da fração protéica presente na parede das micropartículas. Vários trabalhos foram feitos no sentido de melhorar a funcionalidade da parede protéica em paredes poliméricas de filmes visando melhorar propriedades de barreira a água ou a gases e propriedades mecânicas como a resistência a ruptura e a elongação (CARVALHO & GROSSO, 2004) ou em micropartículas coacervadas visando melhorar sua resistência mecânica (THIES, 1995) ou térmica e controle de liberação de recheios hidrofóbicos (DONG *et al*, 2008; XING *et al.*, 2004; FLANAGAN & SINGH, 2006). Desta forma, nesse trabalho foram testados a capacidade de re-hidratação das micropartículas coacervadas submetidas à liofilização, sua resistência a diferentes valores de pH (1, 2 e 7), resistência a presença de SDS em solução (2 e 5%) a temperatura (65°C/15 minutos e 97°C/15 minutos) e resistência a condições entéricas (pepsina, pH 1,2, 37°C, 2h e pancreatina, pH 7, 37°C, 4h) estando os resultados apresentados a seguir.

#### **5.4.1 Inchamento das micropartículas em água após secagem por liofilização**

As micropartículas secas, quando colocadas em água, re-hidrataram em intervalos mínimos de tempo (< 10 segundos), adquirindo o formato esférico original das micropartículas úmidas recém produzidas, aparentemente com manutenção total da integridade das paredes.

A Tabela 5.4, apresenta os diâmetros médios ( $\mu\text{m}$ ), desvios padrões das micropartículas re-hidratadas produzidas a partir da emulsão gelatina/oleoresina de páprica-óleo de soja enquanto a Tabela 5.5, contem as informações referentes as micropartículas produzidas a partir da emulsão goma arábica/oleoresina de páprica-óleo de soja. Com relação as micropartículas sem reticulação (gelatina/oleoresina de páprica-óleo de soja) quando re-hidratadas apresentaram diâmetros médios estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ) em relação ao diâmetro médio das micropartículas úmidas ( $56,60 \mu\text{m}$ ) alcançando o tamanho de  $65,75 \mu\text{m}$  ao longo de 24 horas. Para os tratamentos com a enzima transglutaminase e com glutaraldeído, os diâmetros obtidos pelo efeito de inchamento nos diferentes tempos, não foram estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ ). Pode-se observar também pouca variação quando as medidas foram efetuadas em diferentes tempos, confirmando o inchamento instantâneo das micropartículas. A re-hidratação das micropartículas ocorreu com pouca alteração do aspecto das mesmas, quando comparadas, com as micropartículas úmidas. As micropartículas re-hidratadas readquiriram forma esférica, com manutenção da integridade das micropartículas independentemente da intensidade da reticulação ou da ordem de preparo das emulsões. No entanto observou-se a presença de recheio não encapsulado em suspensão nas imagens das micropartículas após a re-hidratação em quantidades diferenciadas em função do grau de reticulação, sendo em pequenas quantidades nas micropartículas reticuladas com  $50\text{U/g.ptn}$  ou as reticuladas com glutaraldeído e em maior quantidade nas micropartículas sem reticulação.



Aparentemente as micropartículas reticuladas suportaram razoavelmente o processo de secagem por liofilização conforme observado anteriormente (ALVIM, 2005; PRATA, 2006) .

**Tabela 5.4.** Diâmetros médios ( $\mu\text{m}$ ), desvios padrões das micropartículas liofilizadas e re-hidratadas da emulsão gelatina/oleoresina de páprica-óleo de soja.

Tratamento	Micropartículas	Micropartículas liofilizadas e re-hidratadas		
	Úmidas	1 minuto	1 hora	24 horas
GEMSR	56,60 $\pm$ 23,20 <sup>b</sup>	60,80 $\pm$ 26,96 <sup>ab</sup>	64,55 $\pm$ 20,14 <sup>a</sup>	65,75 $\pm$ 18,95 <sup>a</sup>
GEMR10U	60,11 $\pm$ 22,64 <sup>ab</sup>	57,06 $\pm$ 26,20 <sup>b</sup>	59,84 $\pm$ 24,14 <sup>ab</sup>	64,72 $\pm$ 20,69 <sup>a</sup>
GEMR20U	62,33 $\pm$ 26,23 <sup>a</sup>	56,57 $\pm$ 21,55 <sup>a</sup>	56,87 $\pm$ 24,51 <sup>a</sup>	60,77 $\pm$ 26,28 <sup>a</sup>
GEMR30U	58,80 $\pm$ 16,42 <sup>a</sup>	56,37 $\pm$ 18,15 <sup>a</sup>	56,71 $\pm$ 17,29 <sup>a</sup>	58,26 $\pm$ 18,56 <sup>a</sup>
GEMR40U	61,63 $\pm$ 21,23 <sup>a</sup>	52,53 $\pm$ 19,40 <sup>b</sup>	60,95 $\pm$ 18,96 <sup>a</sup>	59,37 $\pm$ 21,71 <sup>a</sup>
GEMR50U	58,95 $\pm$ 20,69 <sup>a</sup>	50,22 $\pm$ 18,91 <sup>b</sup>	57,73 $\pm$ 20,05 <sup>ab</sup>	59,33 $\pm$ 25,48 <sup>a</sup>
GEGLU	68,18 $\pm$ 27,05 <sup>a</sup>	56,61 $\pm$ 19,49 <sup>b</sup>	63,80 $\pm$ 20,80 <sup>ab</sup>	65,49 $\pm$ 27,66 <sup>a</sup>

Nota: letras diferentes na mesma linha representam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as médias obtidas através do teste Tukey.

Comportamento semelhante foi observado quando a emulsão goma arábica/oleoresina de páprica-óleo de soja foi utilizada para a produção de micropartículas (Tabela 5.5). O inchamento foi instantâneo as micropartículas, retomaram a esfericidade e o tamanho originalmente apresentado pelas partículas úmidas após sua produção. Micropartículas sem reticulação apresentaram diâmetro ligeiramente aumentado em relação ao diâmetro úmido, enquanto uma tendência de decréscimo do tamanho médio em função da intensidade de reticulação parece ocorrer para os níveis mais altos de reticulação enzimática (40 e 50U/g.ptn) ou química. Este efeito foi observado anteriormente para micropartículas produzidas com gelatina goma arábica por conservação complexa (PRATA *et al.*, 2008).

A informação importante é que a re-hidratação manteve as características morfológicas apresentadas antes do processo de secagem. Embora as medidas tenham sido feitas em uma quantidade razoáveis de micropartículas (500 unidades), a avaliação quantitativa das variações de diâmetro deve ser observada cuidadosamente uma vez que os desvios padrões são altos conseqüentemente apresentando altos valores do coeficiente de variação. A outra limitação diz respeito à forma como a re-hidratação é medida; alguns trabalhos preferem utilizar a variação de peso para inferir sobre a capacidade de inchamento após a reticulação (BIGI *et al* , 2001)

**Tabela 5.5.** Diâmetros médios ( $\mu\text{m}$ ), desvios padrões das micropartículas liofilizadas e re-hidratadas da emulsão goma arábica/oleoresina de páprica-óleo de soja.

Tratamento	Micropartículas	Micropartículas liofilizadas e re-hidratadas		
	Úmidas	1 minuto	1 hora	24 horas
GAMSR	55,66 $\pm$ 15,58 <sup>c</sup>	57,43 $\pm$ 19,35 <sup>c</sup>	67,62 $\pm$ 23,87 <sup>b</sup>	77,26 $\pm$ 18,90 <sup>a</sup>
GAMR10U	60,94 $\pm$ 20,05 <sup>a</sup>	57,36 $\pm$ 23,27 <sup>ab</sup>	54,60 $\pm$ 19,69 <sup>b</sup>	59,17 $\pm$ 20,22 <sup>ab</sup>
GAMR20U	56,57 $\pm$ 16,20 <sup>ab</sup>	54,12 $\pm$ 20,02 <sup>b</sup>	54,48 $\pm$ 18,46 <sup>b</sup>	58,87 $\pm$ 23,48 <sup>a</sup>
GAMR30U	58,56 $\pm$ 23,77 <sup>bc</sup>	51,68 $\pm$ 22,41 <sup>c</sup>	67,08 $\pm$ 24,93 <sup>a</sup>	62,43 $\pm$ 31,69 <sup>ab</sup>
GAMR40U	61,26 $\pm$ 14,56 <sup>a</sup>	48,85 $\pm$ 14,87 <sup>c</sup>	52,16 $\pm$ 14,76 <sup>bc</sup>	54,19 $\pm$ 19,19 <sup>b</sup>
GAMR50U	60,92 $\pm$ 15,80 <sup>a</sup>	50,13 $\pm$ 15,49 <sup>b</sup>	53,97 $\pm$ 18,16 <sup>b</sup>	53,61 $\pm$ 15,71 <sup>b</sup>
GAGLU	69,84 $\pm$ 26,66 <sup>a</sup>	58,58 $\pm$ 20,50 <sup>b</sup>	61,05 $\pm$ 19,44 <sup>b</sup>	61,19 $\pm$ 28,08 <sup>b</sup>

Nota: letras diferentes na mesma linha representam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as médias obtidas através do teste Tukey.

#### **5.4.2 Resistência das micropartículas em soluções contendo dodecil sulfato de sódio (2 e 5%)**

A resistência das micropartículas às soluções aquosas de SDS nas concentrações de 2% e 5% foi avaliada por microscopia ótica e através da medida do diâmetro médio após permanência nas soluções por um intervalo de uma hora e estão apresentadas na Tabela 5.6 e Figura 5.3, para micropartículas produzidas a partir da emulsão gelatina/oleoresina de páprica-óleo de soja e na Tabela 5.7 e Figura 5.4 para as micropartículas produzidas a partir da emulsão goma arábica/oleoresina de páprica-óleo de soja.

Os surfactantes são compostos que, possuem atividade na superfície da interface entre duas fases, tais como ar-água, óleo-água, e na superfície de sólidos. Também são conhecidos como agentes tensoativos. Tais compostos caracterizam-se por possuir duas regiões distintas na mesma molécula: uma região polar (hidrofílica) e outra região não-polar (hidrofóbica) (DESAI & BANAT, 1997). O Dodecil Sulfato de Sódio (SDS), é um exemplo destes compostos tensoativos. Este apresenta uma longa cadeia alquílica, praticamente insolúvel em água, ligada covalentemente a um grupo iônico, o sulfato de sódio ( $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{SO}_4^- \text{Na}^+$ ). Esta particularidade na estrutura química dos surfactantes é responsável pelos fenômenos de atividade na tensão superficial de interfaces, pela micelização e solubilização. As proteínas em presença de SDS e beta-mercaptoetanol dissociam-se nas suas subunidades de modo que a separação electroforética permite o cálculo da massa molar das cadeias polipeptídicas de proteínas oligoméricas. O dodecil sulfato de sódio com seu forte poder desnaturante é muito utilizado para a quebra de estruturas quaternária, terciária e secundária de proteínas (JONES, 1988).

Os resultados observados permitem avaliar generalizadamente os efeitos produzidos pelo SDS. Independentemente do tipo de preparo das emulsões, micropartículas não reticuladas foram desfeitas independente das concentrações utilizadas de SDS (~10 minutos). Independente dos tratamentos (intensidade de reticulação ou tipo de emulsão) as micropartículas após

tratamento com SDS apresentaram aumento de diâmetro em relação ao diâmetro das micropartículas úmidas reticuladas e mantidas em água, sendo que as micropartículas com menor intensidade de reticulação (10U/g.ptn) apresentaram os maiores diâmetros decorrentes do maior inchamento, como esperado. O grau de reticulação deveria controlar a variação de tamanho das micropartículas a partir da inserção de ligações cruzadas na parede das micropartículas. Estes efeitos já foram anteriormente apresentados na literatura (PRATA *et al.*, 2008; ALVIM, 2005).

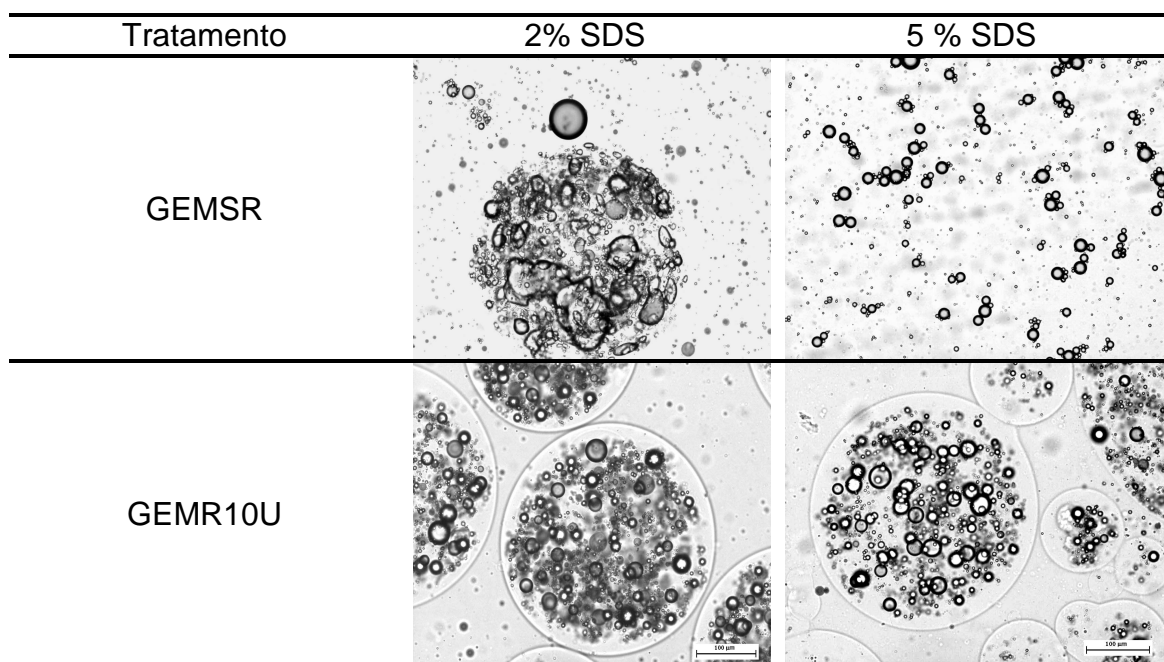
Embora a reticulação tenha permitido manter uma aparente integridade das micropartículas no meio SDS, pode-se observar a presença de material de recheio colorido em todos os sistemas estudados, com aumento da quantidade conforme diminuía a intensidade de reticulação enzimática. Menor quantidade de oleoresina de páprica externa foi observado para micropartículas reticuladas com glutaraldeído independente da ordem de preparo das emulsões.

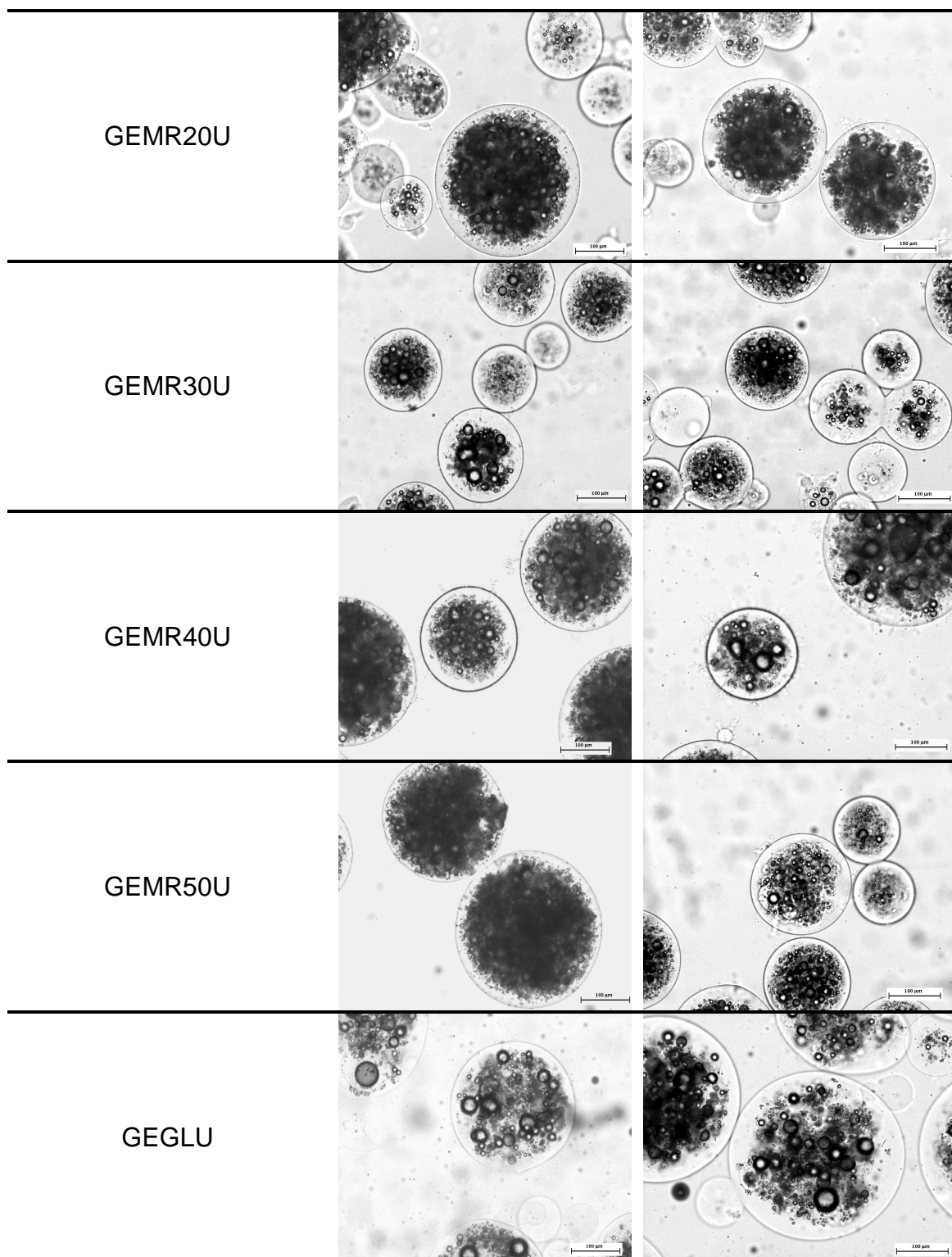
O efeito da interação do SDS na estrutura da gelatina foi anteriormente relatado por alterar a conformação e dimensão da molécula de gelatina em solução. Isto pode ser refletido na consistência das soluções e géis de gelatina (GAUTAM & SCHOTT, 1994; SEEBOTH *et al.*, 1990), adsorção na interfase, estrutura e porosidade de micropartículas formadas por gelatina (SOVILJ *et al.*, 1993; SOLVILJ, 1998).

**Tabela 5.6.** Diâmetros médios ( $\mu\text{m}$ ), respectivos desvios padrões das micropartículas coacervadas úmidas da emulsão gelatina/oleoresina de páprica-óleo de soja após 1h de suspensão em solução de SDS (2% e 5%).

Tratamento	Micropartículas Úmidas	2% SDS	5% SDS
GEMSR	56,60 $\pm$ 23,20	—	—
GEMR10U	60,11 $\pm$ 22,64 <sup>b</sup>	98,48 $\pm$ 54,06 <sup>a</sup>	101,82 $\pm$ 57,00 <sup>a</sup>
GEMR20U	62,33 $\pm$ 26,23 <sup>b</sup>	76,82 $\pm$ 26,24 <sup>a</sup>	80,45 $\pm$ 29,56 <sup>a</sup>
GEMR30U	58,80 $\pm$ 16,42 <sup>b</sup>	75,71 $\pm$ 36,18 <sup>a</sup>	79,15 $\pm$ 29,54 <sup>a</sup>
GEMR40U	61,63 $\pm$ 21,23 <sup>b</sup>	73,84 $\pm$ 27,13 <sup>a</sup>	75,29 $\pm$ 39,63 <sup>a</sup>
GEMR50U	58,95 $\pm$ 20,69 <sup>b</sup>	71,26 $\pm$ 38,84 <sup>a</sup>	74,77 $\pm$ 00,85 <sup>a</sup>
GEGLU	68,18 $\pm$ 27,05 <sup>b</sup>	79,23 $\pm$ 35,26 <sup>ab</sup>	83,84 $\pm$ 37,42 <sup>a</sup>

Nota: letras diferentes na mesma linha representam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as médias obtidas através do teste Tukey.



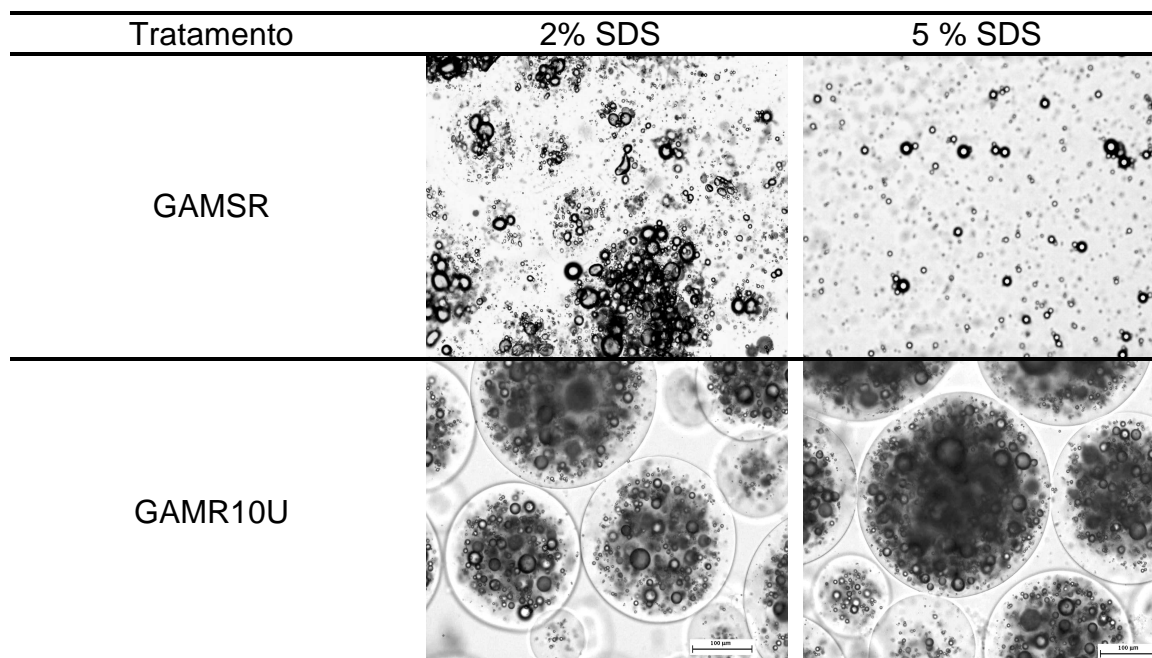


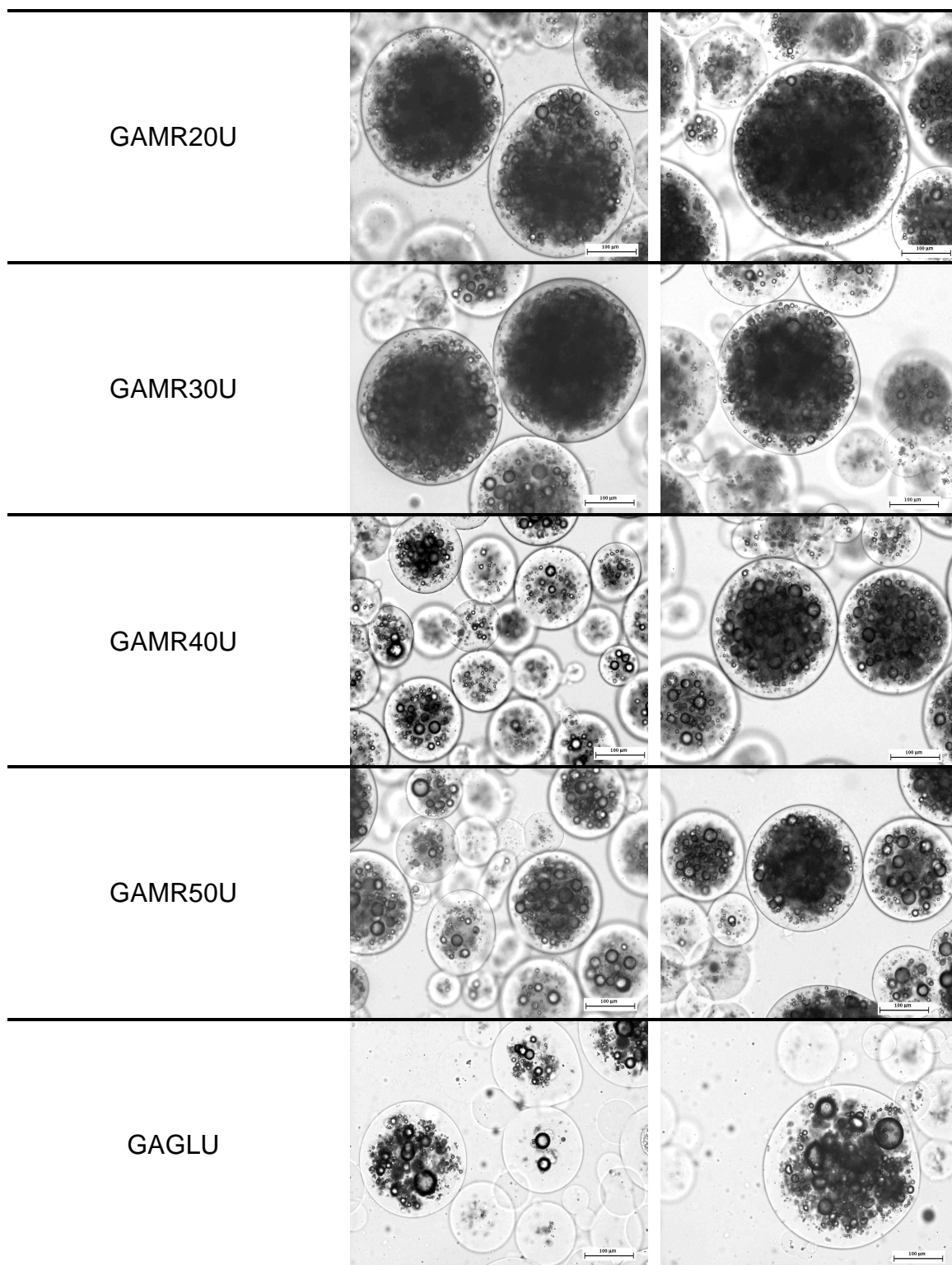
**Figura 5.3.** Imagens das micropartículas coacervadas úmidas da emulsão gelatina/oleoresina de páprica-óleo de soja após 1h de suspensão em solução de SDS (2% e 5%) obtidas por microscopia ótica. Barra= 100 µm.

**Tabela 5.7.** Diâmetros médios ( $\mu\text{m}$ ), respectivos desvios padrões das micropartículas coacervadas úmidas da emulsão goma arábica/oleoresina de páprica-óleo de soja após 1h de suspensão em solução de SDS (2% e 5%).

Tratamento	Micropartículas Úmidas	2% SDS	5% SDS
GAMSR	55,66 $\pm$ 15,58	—	—
GAMR10U	60,94 $\pm$ 20,05 <sup>b</sup>	87,65 $\pm$ 32,55 <sup>a</sup>	91,39 $\pm$ 36,84 <sup>a</sup>
GAMR20U	56,57 $\pm$ 16,20 <sup>b</sup>	80,62 $\pm$ 22,00 <sup>a</sup>	79,89 $\pm$ 30,56 <sup>a</sup>
GAMR30U	58,56 $\pm$ 23,77 <sup>b</sup>	75,79 $\pm$ 31,51 <sup>a</sup>	78,71 $\pm$ 29,58 <sup>a</sup>
GAMR40U	61,26 $\pm$ 14,56 <sup>b</sup>	71,23 $\pm$ 19,66 <sup>a</sup>	72,05 $\pm$ 18,74 <sup>a</sup>
GAMR50U	60,92 $\pm$ 15,80 <sup>c</sup>	68,65 $\pm$ 20,28 <sup>b</sup>	73,98 $\pm$ 21,67 <sup>a</sup>
GAGLU	69,84 $\pm$ 26,66 <sup>b</sup>	77,72 $\pm$ 31,45 <sup>a</sup>	86,56 $\pm$ 34,05 <sup>a</sup>

Nota: letras diferentes na mesma linha representam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as médias obtidas através do teste Tukey.



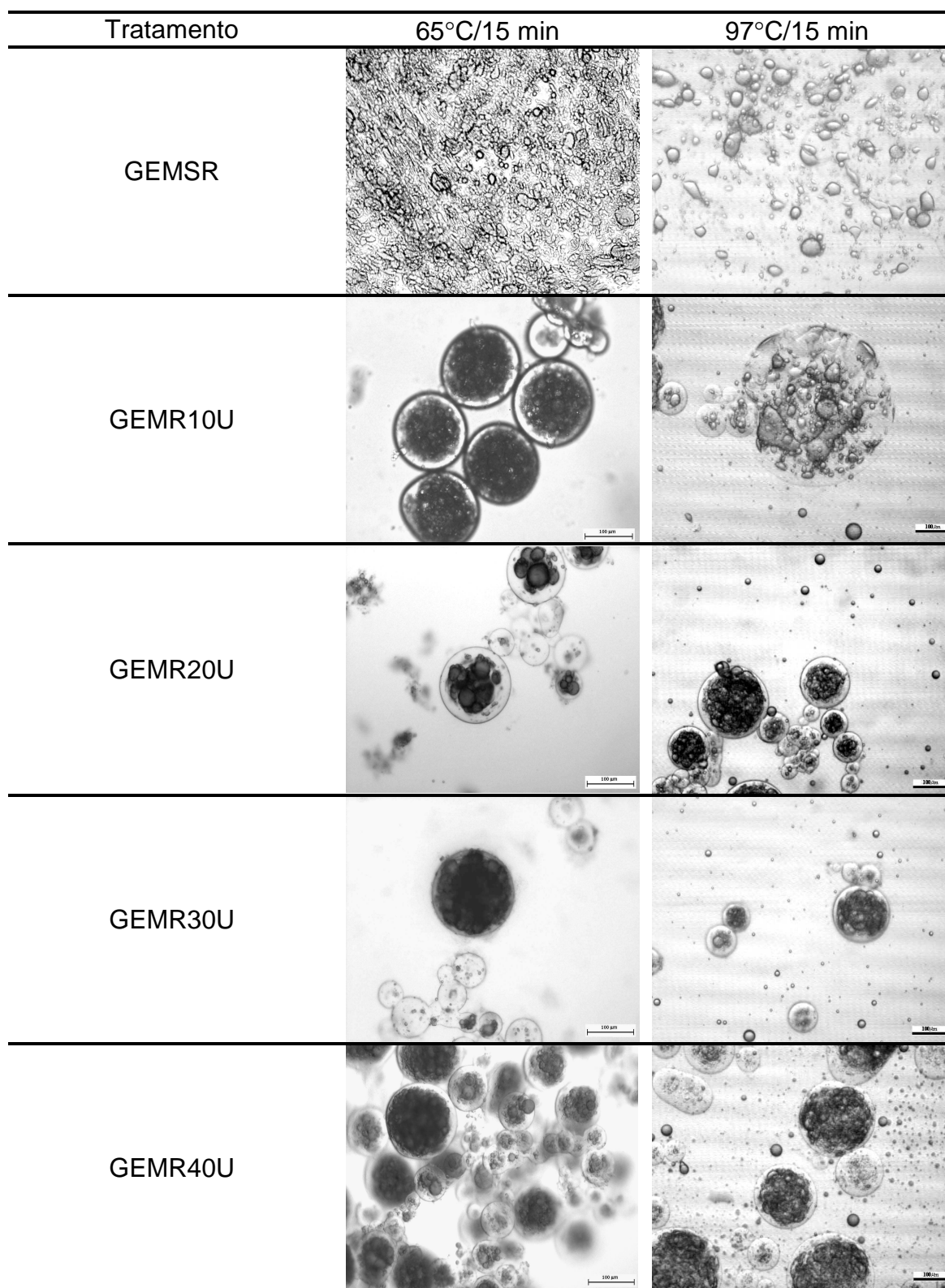


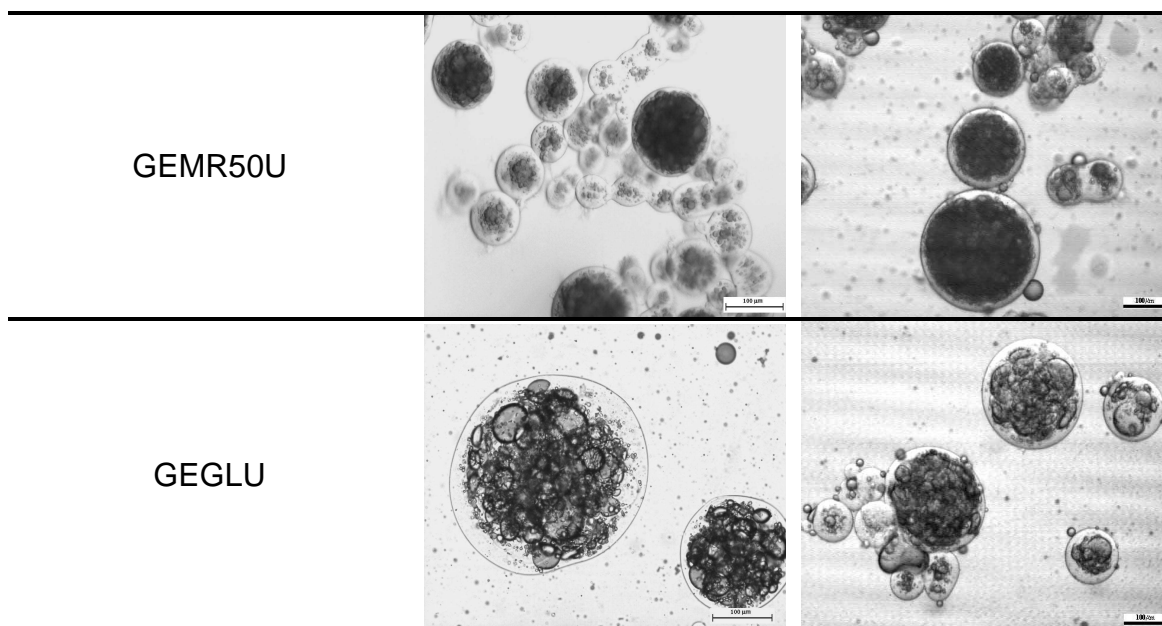
**Figura 5.4.** Imagens das micropartículas coacervadas úmidas da emulsão goma arábica/oleoresina de páprica-óleo de soja após 1h de suspensão em solução de SDS (2% e 5%) obtidas por microscopia ótica. Barra= 100 µm.



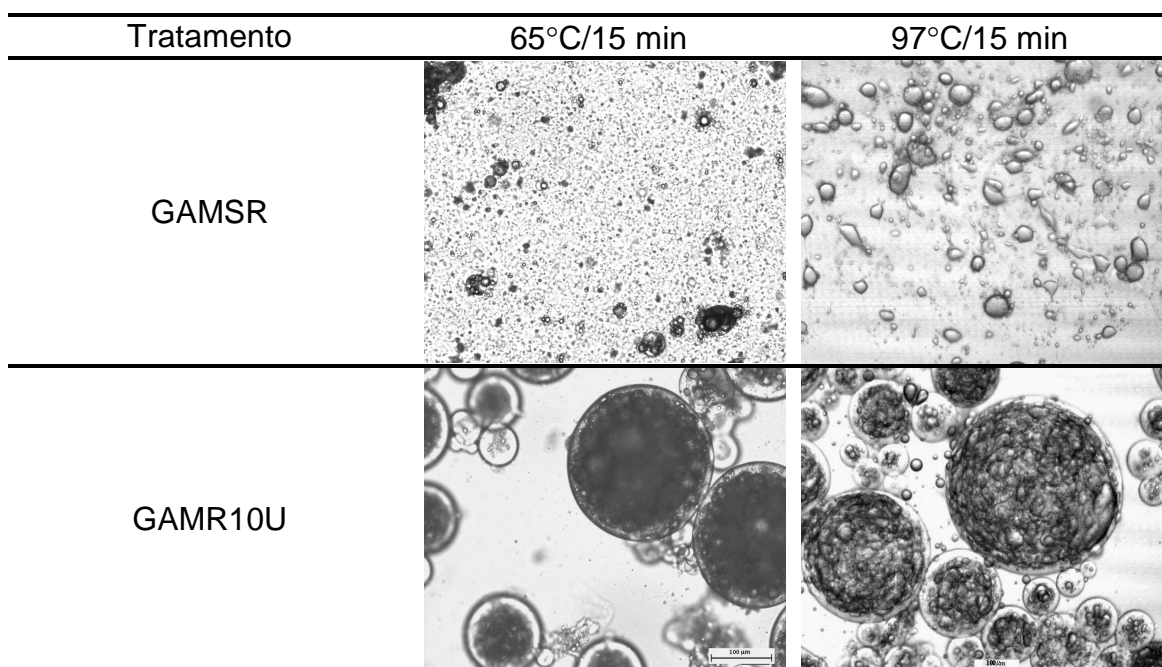
#### 5.4.3 Avaliação da resistência das micropartículas a diferentes temperaturas por microscopia ótica

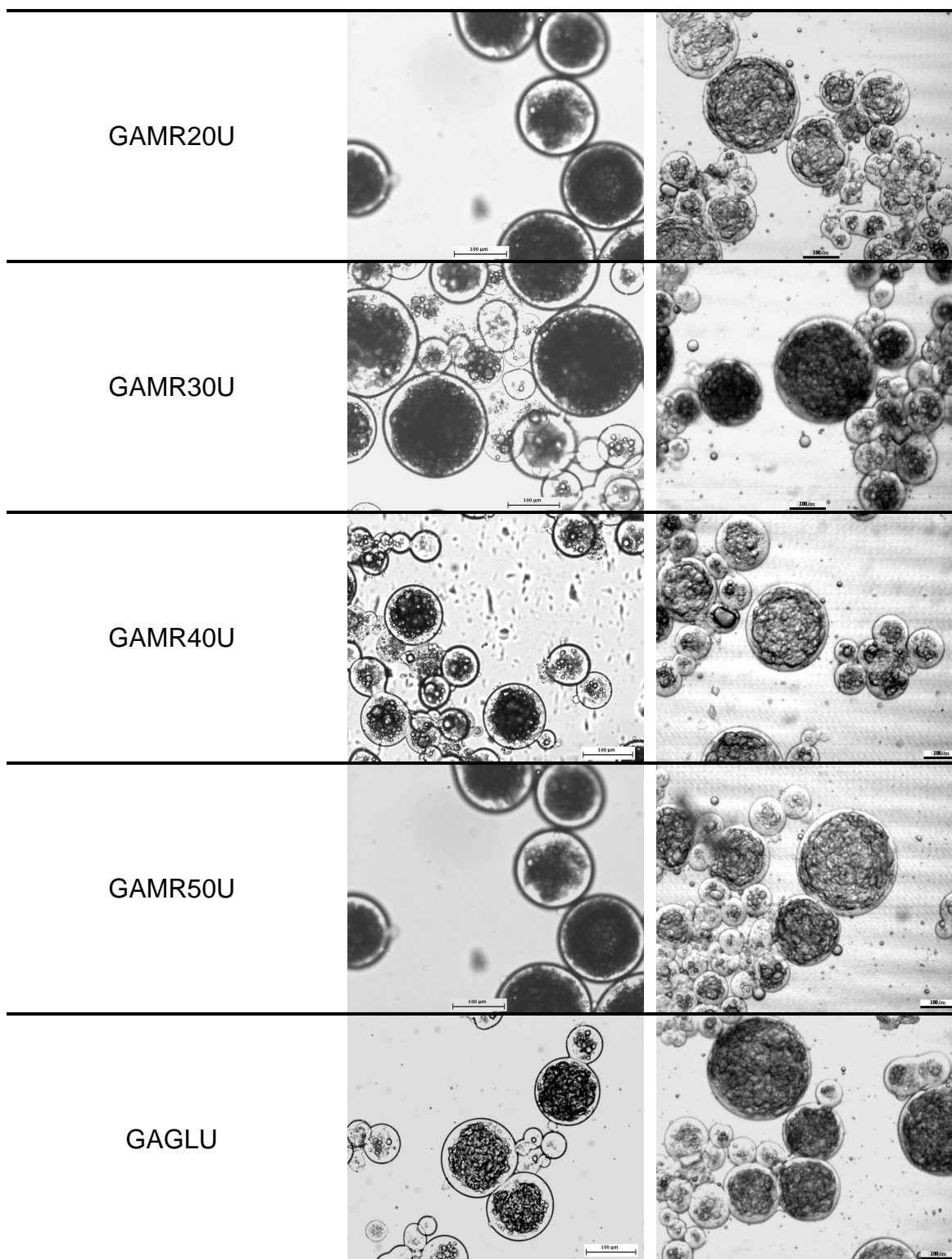
A resistência das micropartículas a dois diferentes tratamentos térmicos (65 e 97°C/15 min) foi avaliada qualitativamente utilizando-se a microscopia ótica para captar imagens das micropartículas após os tratamentos. As Figuras 5.5 (emulsão gelatina/oleoresina de páprica-óleo de soja) e 5.6 (emulsão goma arábica/oleoresina de páprica-óleo de soja) apresentam as micrografias obtidas. De forma análoga ao efeito do SDS, o efeito das temperaturas pode ser generalizável. Nos dois tipos de emulsão, micropartículas não reticuladas não suportaram nenhum dos dois tratamentos térmicos e solubilizaram totalmente após o tempo do experimento, liberando totalmente o recheio. Na temperatura mais alta (97°C/15min) micropartículas produzidas com a emulsão gelatina/oleoresina de páprica-óleo de soja no menor nível de reticulação enzimática não se desfizeram, mas foram sensivelmente alteradas quanto à exposição de recheio. Na emulsão goma arábica/oleoresina de páprica-óleo de soja as micropartículas no mesmo nível de reticulação permaneceram aparentemente íntegras. A partir de 20U/g.ptn e para as micropartículas reticuladas com glutaraldeído, parece não haver diferença entre as micropartículas e as mesmas resistiram as duas temperaturas estudadas independente do tipo de emulsão empregada. A presença de algumas gotículas de oleoresina de páprica-óleo de soja no meio aquoso pode ser observada, porém não foi quantificada. Em trabalho recente Dong *et al* (2008) encapsularam óleo de menta utilizando goma arábica por coacervação complexa e posteriormente reticularam as micropartículas com diferentes quantidades de transglutaminase e também com formaldeído. Os autores observaram que as micropartículas reticuladas foram resistentes à temperatura de 80°C e a 200°C, apresentando liberação controlada nessa temperatura, decrescente à medida que a quantidade de reticulante enzimático foi aumentada. Além disso, os autores ainda, não observaram diferenças entre micropartículas reticuladas com os dois diferentes agentes quando a concentração de enzima foi otimizada.





**Figura 5.5.** Imagens das micropartículas coacervadas úmidas da emulsão gelatina/oleoresina de páprica-óleo de soja após 15min de incubação em água a 65°C (coluna 2) e 97°C (coluna 3), obtidas por microscopia ótica. Barra= 100 µm.



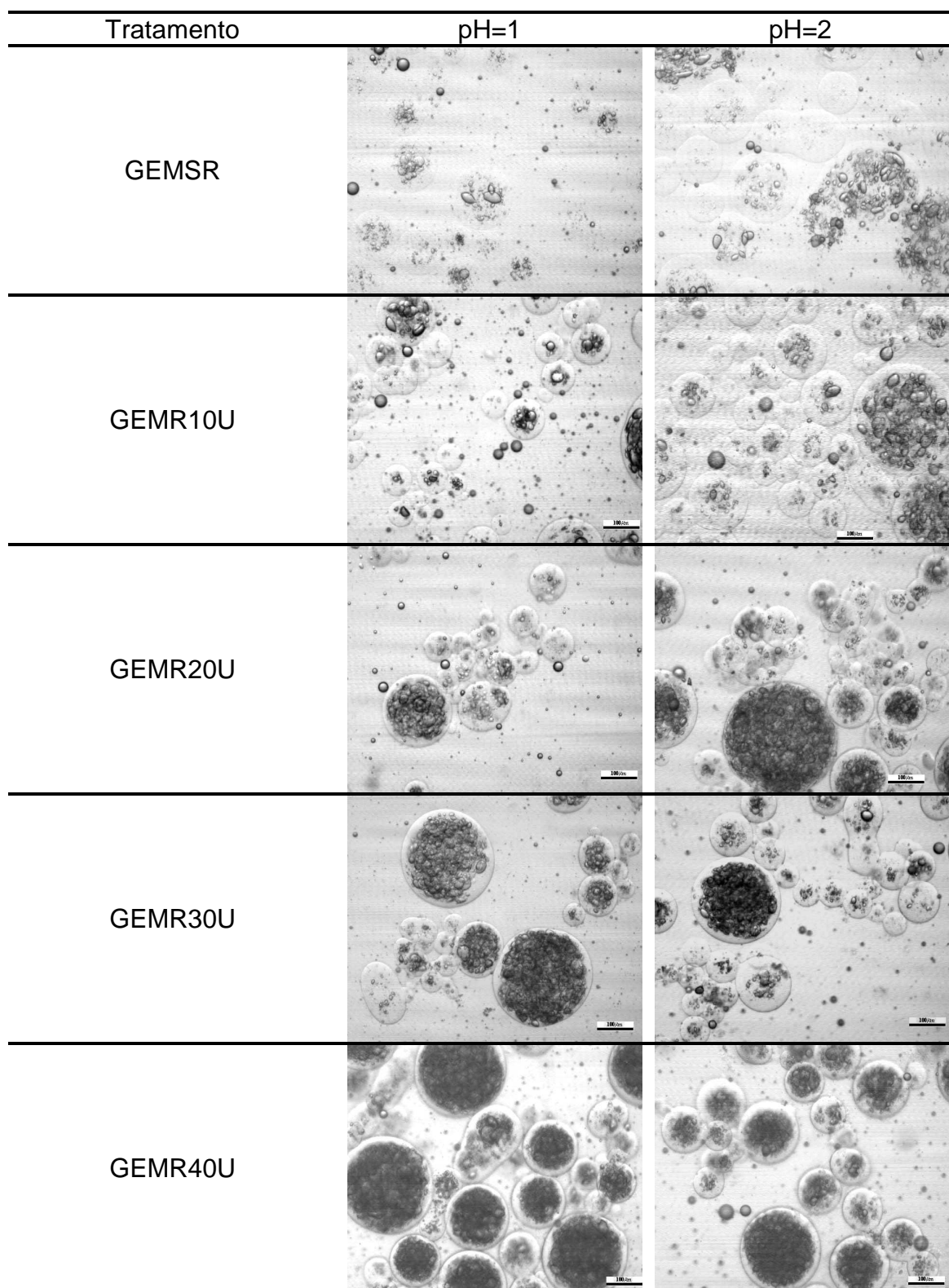


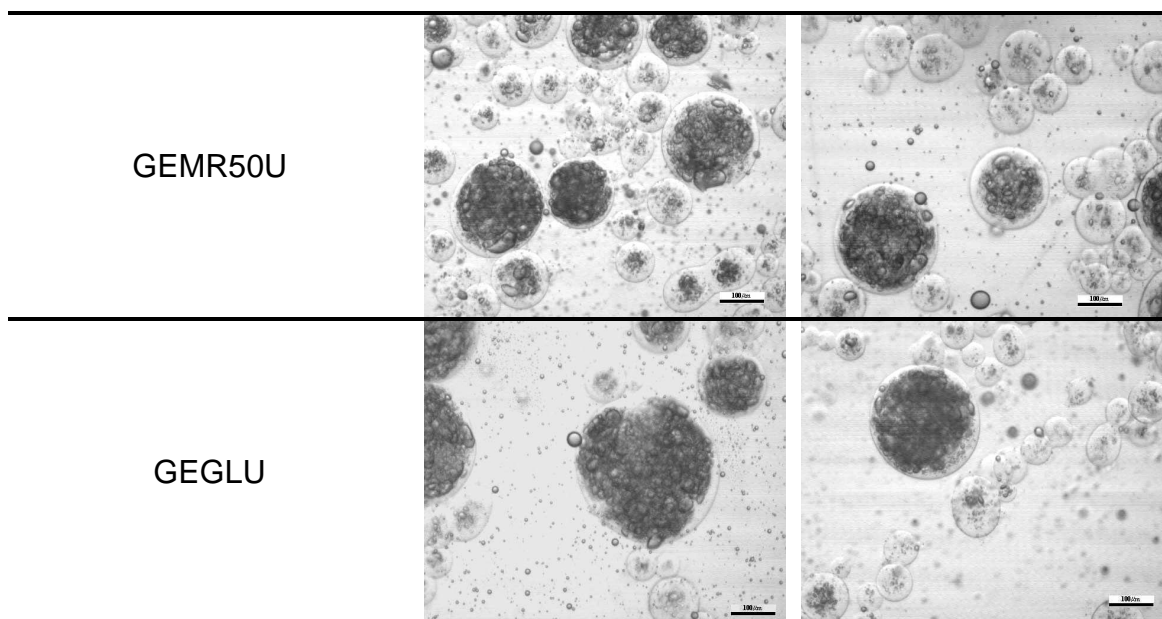
**Figura 5.6.** Imagens das micropartículas coacervadas úmidas da emulsão goma arábica/oleoresina de páprica-óleo de soja após 15min de incubação em água a 65° (coluna 2) e 97°C (coluna 3), obtidas por microscopia ótica. Barra= 100 µm.

#### 5.4.4 Resistência das micropartículas as diferentes condições de pH

As Figuras 5.7 a 5.9 apresentam as micrografias óticas das micropartículas submetidas à incubação em pH 1, 2 e 7 durante 1 hora em solução aquosa. Em pH 7 todas as micropartículas permaneceram íntegras em todos os tratamentos estudados incluindo as micropartículas não reticuladas de ambas as emulsões. Quando o pH foi decrescido para condições muito ácidas (1 e 2) representando condições de pH do estômago, micropartículas não reticuladas em pH 1 e 2 na emulsão gelatina/oleoresina de páprica-óleo de soja foram praticamente desfeitas enquanto nas mesmas condições as produzidas com a emulsão goma arábica/oleoresina de páprica-óleo de soja aparentemente foram mais resistentes, sendo modificadas, porém não se desfizeram. Com a introdução da reticulação as micropartículas passaram a resistir mantendo-se íntegras independente da quantidade de reticulante, do tipo de reticulante e da forma em que as emulsões foram preparadas.

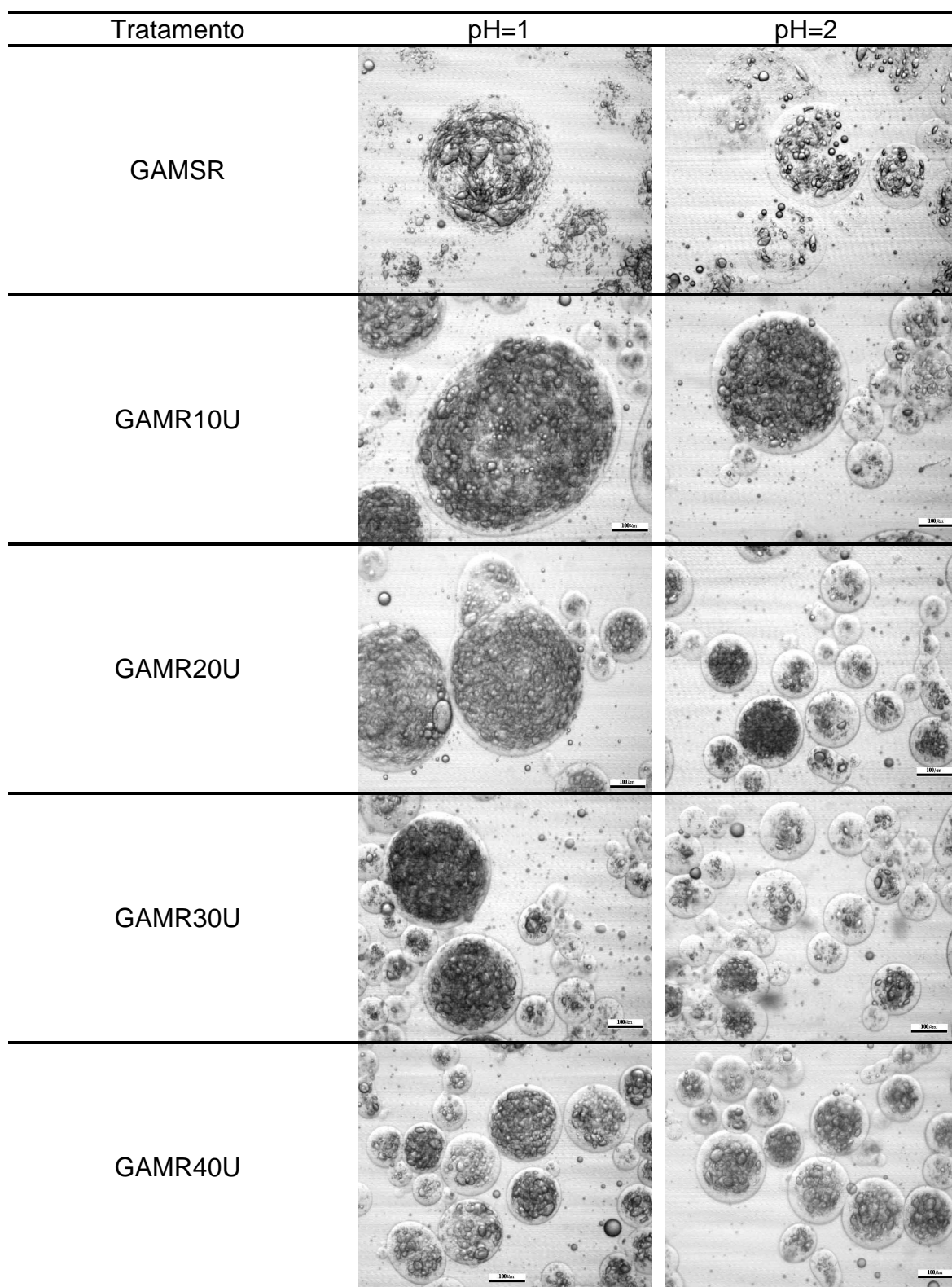
A formação das micropartículas como já discutido requer um ajuste fino de pH para que o balanço de cargas seja equalizado, ocorra a separação de fases e a formação das micropartículas. No caso do presente trabalho, o pH de coacervação foi ajustado para 4. Com a perspectiva de manter essa condição, cabe ressaltar que as condições de pH das reticulações foram mantidas distantes da faixa ótima de atuação enzimática (pH 5-8) (MOTOKI *et al.*, 1987) e de atuação do reticulante químico (pH 9) (THIES, 1995) e, portanto a eficiência de *crosslinking* ainda pode ser melhorada ou a quantidade de reticulante diminuída caso as reações sejam feitas em pH superiores ao pH 4, utilizado no presente trabalho. Perturbações na estabilidade do complexo foram observadas em diferentes pares poliméricos em condições ácidas (SCHMITT *et al.*, 1998).



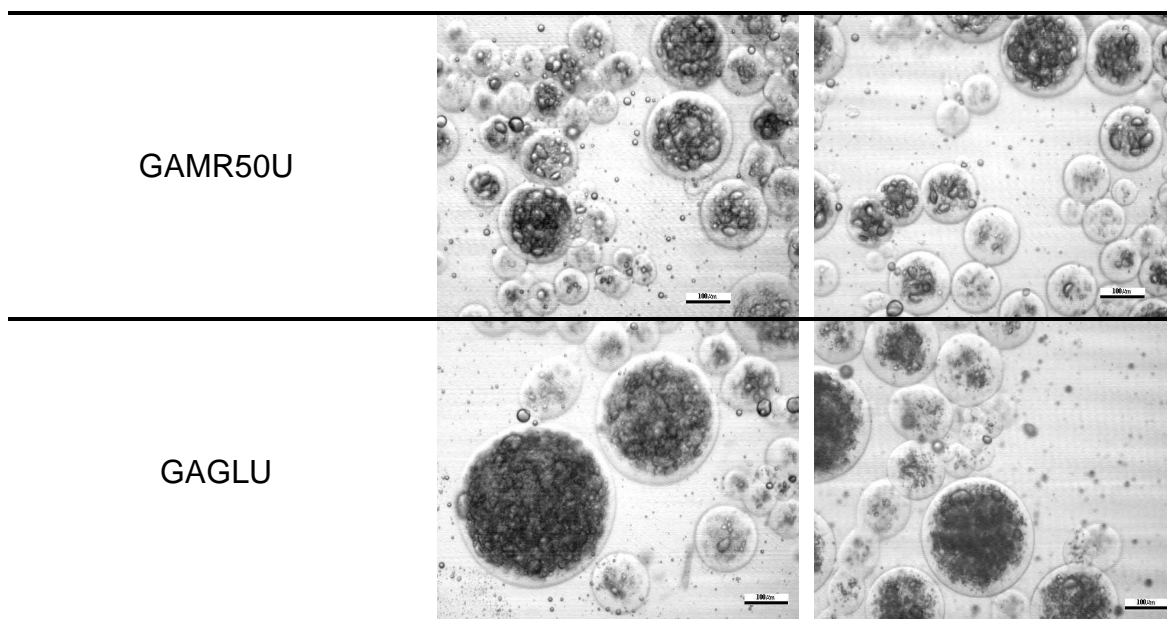


**Figura 5.7.** Imagens das micropartículas coacervadas liofilizadas da emulsão gelatina/oleoresina de páprica-óleo de soja após 1h de incubação em solução aquosa pH 1 (coluna 2) e pH 2 (coluna 3), obtidas por microscopia ótica. Barra= 100  $\mu$ m.

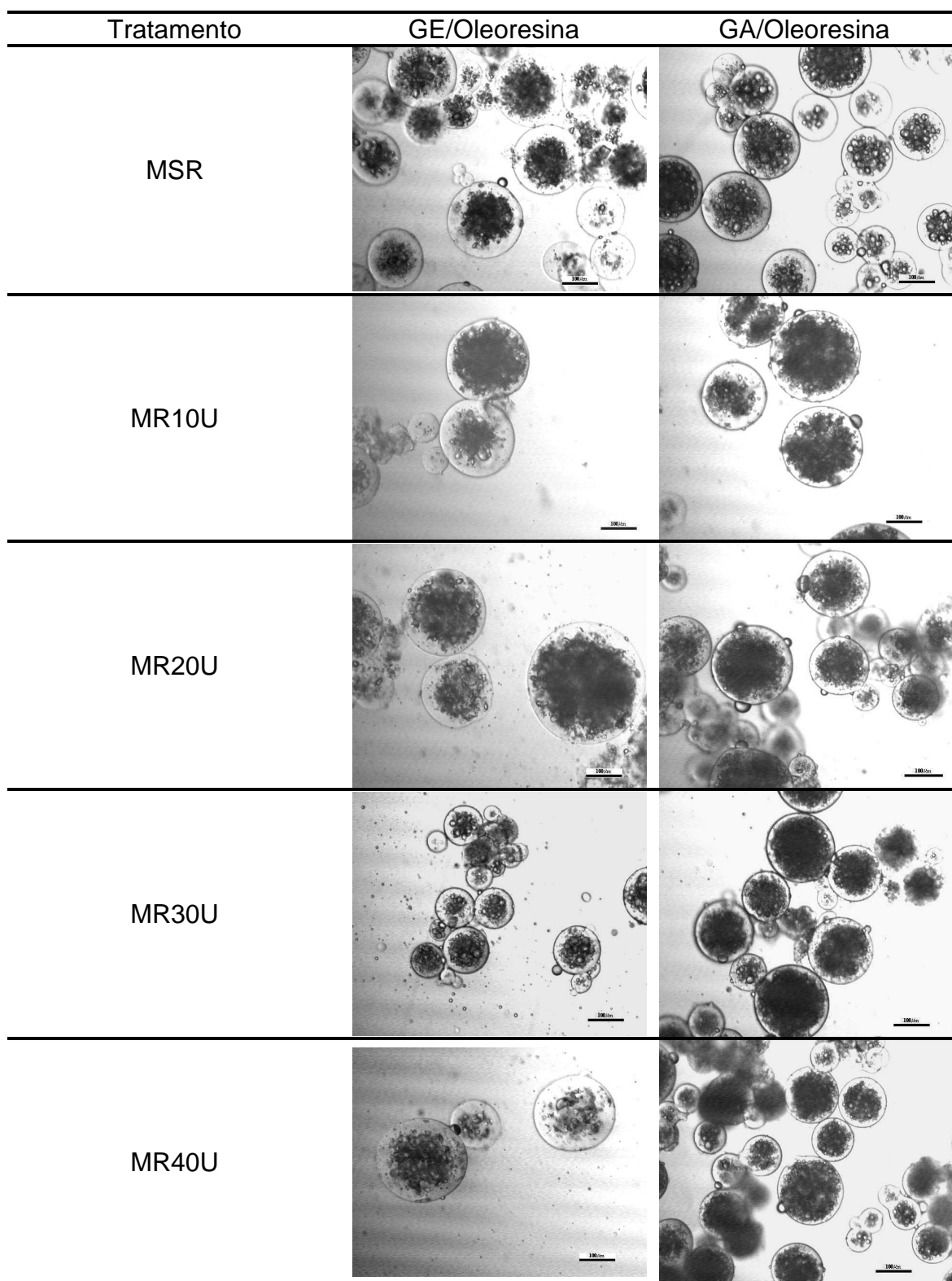


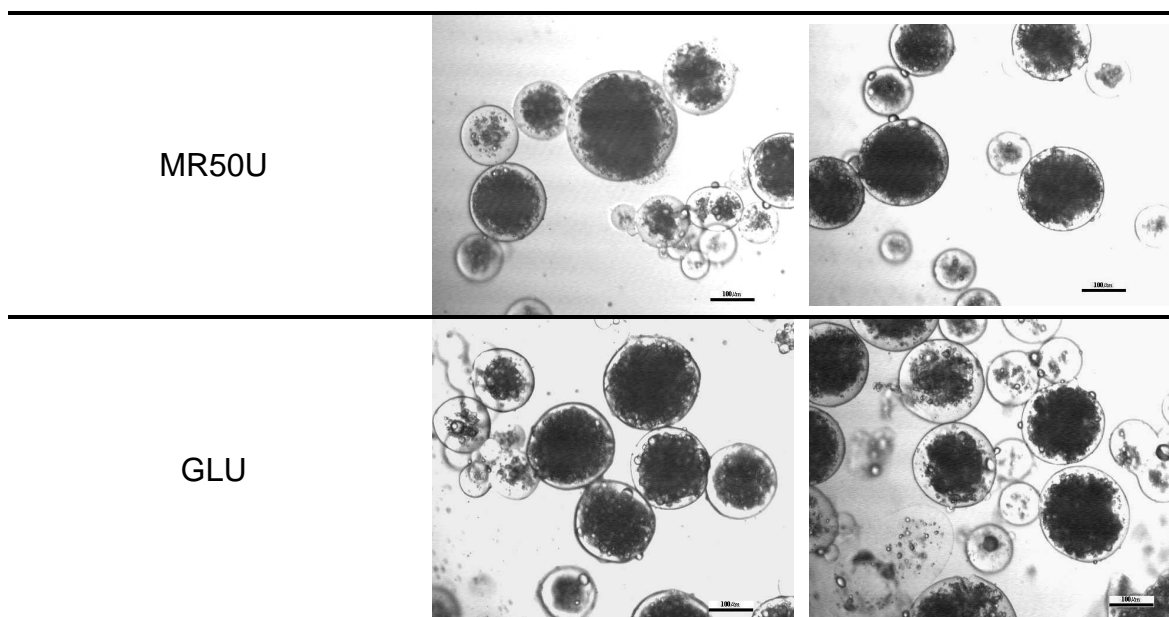






**Figura 5.8.** Imagens das micropartículas coacervadas liofilizadas da emulsão goma arábica/oleoresina de páprica-óleo de soja após 1h de incubação em solução aquosa pH 1 (coluna 2) e pH 2 (coluna 3), obtidas por microscopia ótica. Barra= 100  $\mu$ m.





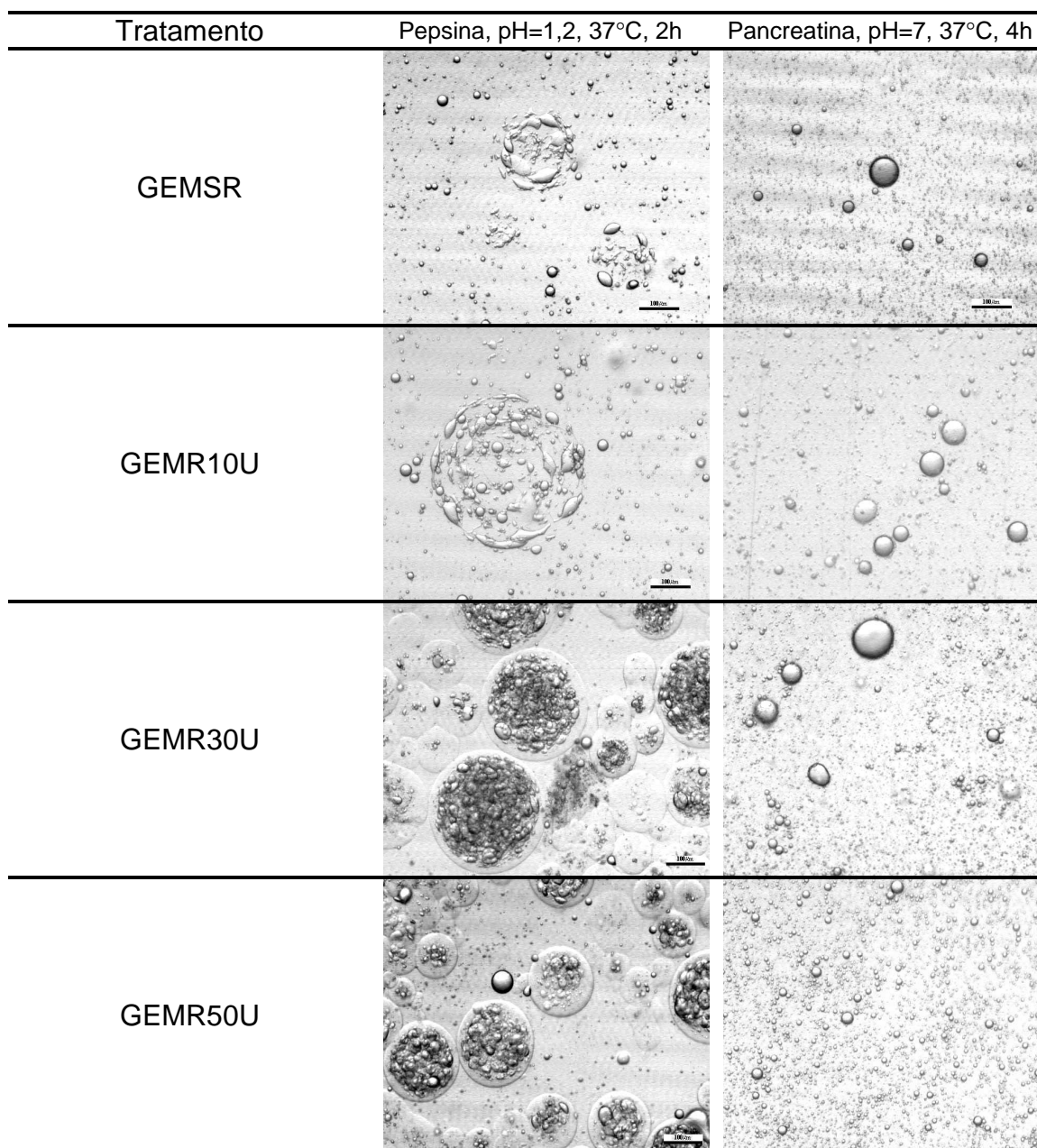
**Figura 5.9.** Imagens das micropartículas coacervadas liofilizadas após 1h de incubação em solução aquosa pH 7 (coluna 2: emulsão gelatina/oleoresina de páprica-óleo de soja e coluna 3: emulsão goma arábica/oleoresina de páprica-óleo de soja), obtidas por microscopia ótica. Barra= 100 µm.

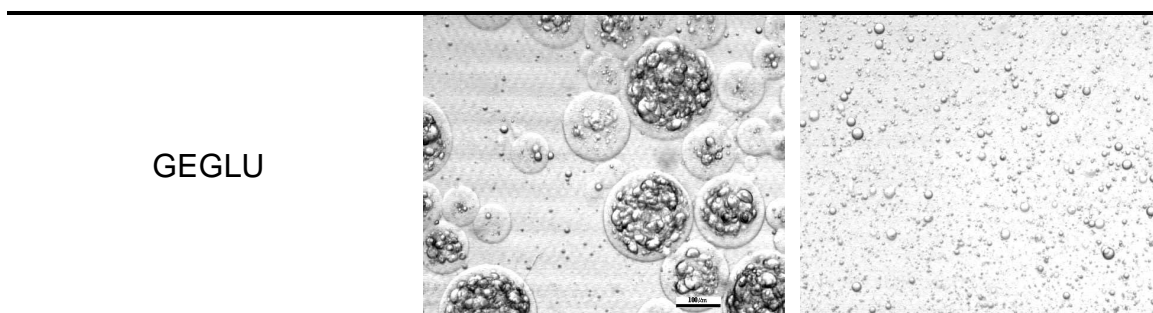
#### **5.4.5 Resistência das micropartículas à ação das enzimas digestivas (pepsina e pancreatina)**

As Figuras 5.10 e 5.11 apresentam as micrografias das micropartículas submetidas à ação enzimática, temperatura e pH característico do estômago (2h) e posterior troca por condições intestinais (4h) para as micropartículas produzidas com a emulsão gelatina/oleoresina de páprica-óleo de soja e goma arábica/oleoresina de páprica-óleo de soja respectivamente.

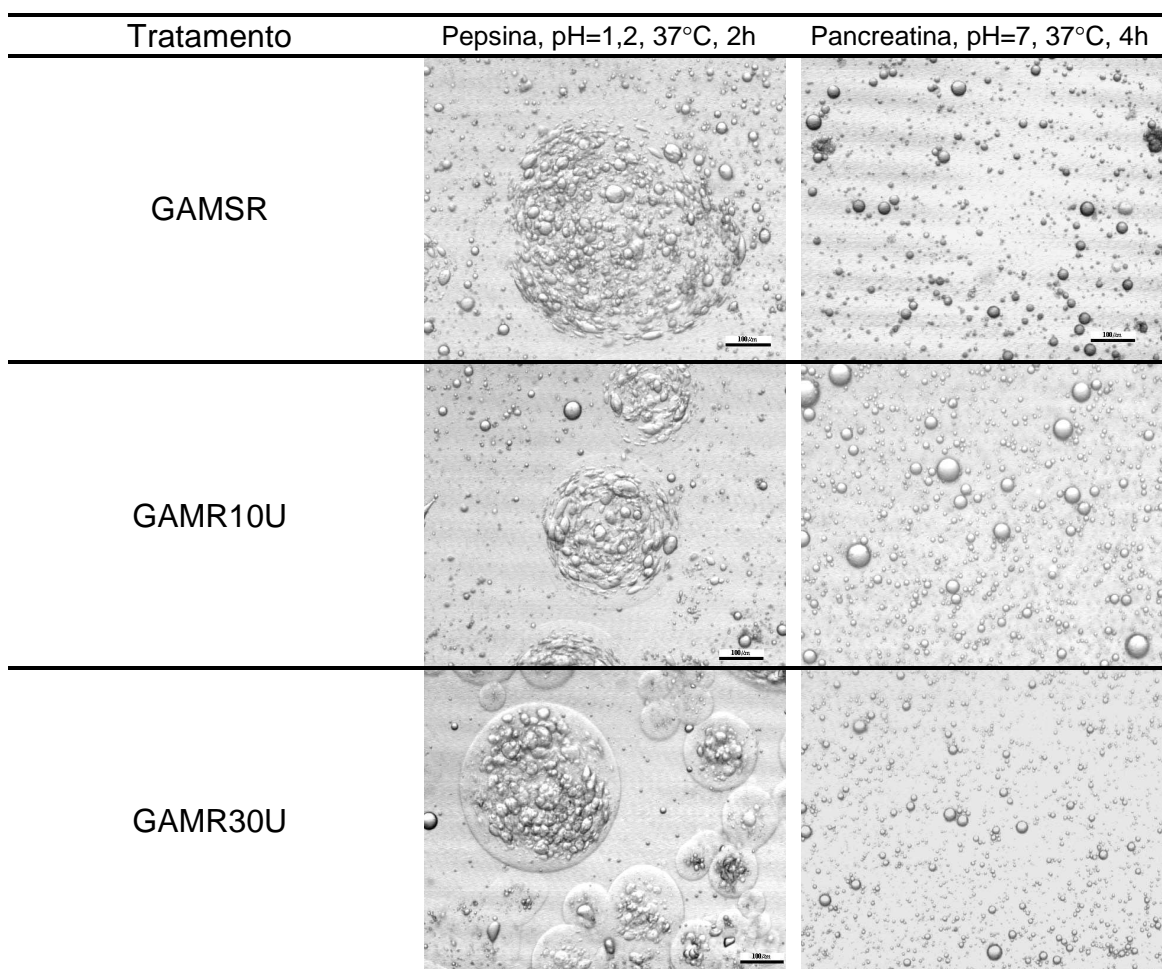
Novamente as observações são generalizadas. Micropartículas não reticuladas e as reticuladas com 10U/g.ptn foram bastante danificadas após duas horas de incubação. Micropartículas reticuladas com altas quantidades de enzimas (30 e 50U/g.ptn) ou reticuladas com glutaraldeído mantiveram sua integridade nas condições do estômago após duas horas. Todas as micropartículas independente da quantidade de enzima, tipo de reticulante e forma

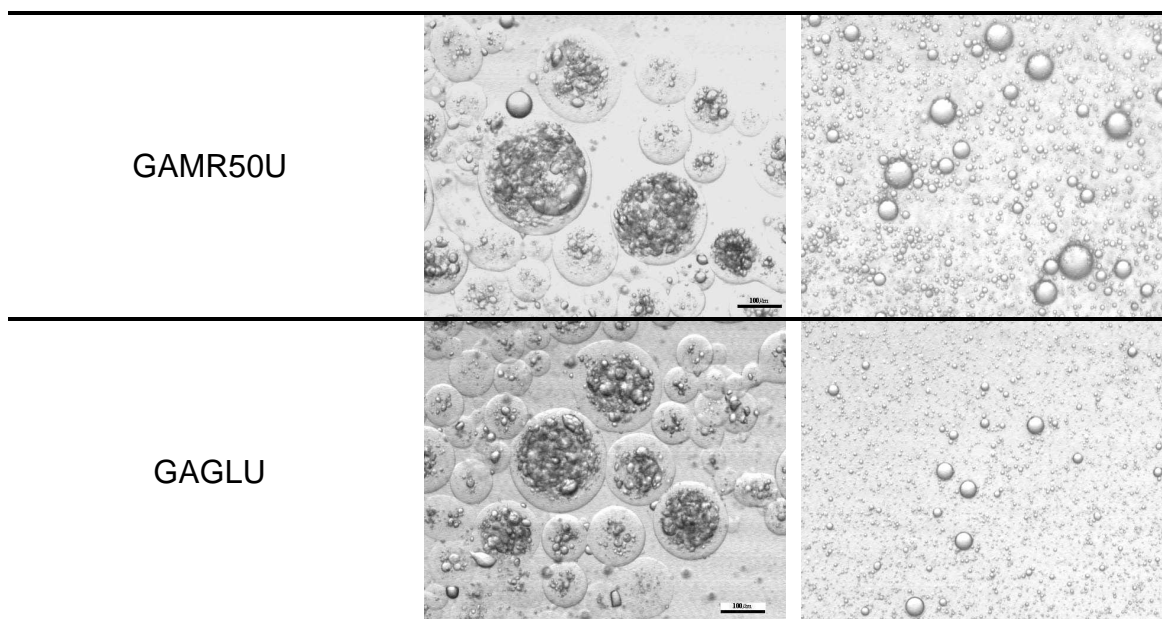
de preparo das emulsões foram destruídas, resultando em liberação total do material de recheio encapsulado nas condições que simulavam o ambiente intestinal.





**Figura 5.10.** Imagens das micropartículas coacervadas liofilizadas da emulsão gelatina/oleoresina de páprica-óleo de soja após 2h de incubação em solução de pepsina (2,65U/mg. ptn) e 4h de incubação em solução de pancreatina (0,15mg/mL), obtidas por microscopia ótica. Barra= 100  $\mu$ m.





**Figura 5.11.** Imagens das micropartículas coacervadas liofilizadas da emulsão goma arábica/oleoresina de páprica-óleo de soja após 2h de incubação em solução de pepsina (2,65U/mg. ptn) e 4h de incubação em solução de pancreatina (0,15mg/mL), obtidas por microscopia ótica. Barra= 100 µm.

## 5.5 Estudo da eficiência da reticulação

O efeito das diferentes quantidades de enzima/substrato e da ordem de preparação da emulsão foi estudado quanto a possível eficiência da reticulação nas micropartículas afetar a porosidade da parede das mesmas e como consequência à modulação diferenciada de liberação do recheio hidrofóbico em um meio de liberação líquido. Foi também avaliada a intensidade de liberação de micropartículas reticuladas com glutaraldeído ao longo do tempo, nas mesmas condições de temperatura e agitação dos sistemas reticulados enzimaticamente.

Preliminarmente, diferentes alternativas e material de recheio hidrofóbico foram testados. Timol um composto com atividade farmacológica anti-helmíntica é um composto hidrofóbico e tentativamente foi escolhido para acompanhar a liberação. A escolha também se baseou na verificação de que o timol apresentou boa solubilidade na mistura oleoresina de páprica-óleo de soja que foi utilizada em todos os experimentos do presente trabalho e portanto deveria ser mantida nos experimentos finais de liberação. A solubilidade apresentada pelo timol permitiu que ele fosse solubilizado nessa mistura e encapsulado nas micropartículas. Para que a liberação fosse corretamente efetuada diversos meios foram testados, iniciando-se por um meio aquoso contendo SDS 1%. Esta estratégia foi anteriormente utilizada para um composto hidrofóbico fluorescente (PRATA *et al.*, 2008). Foi observado que timol apresentava solubilidade no meio em quantidade suficiente para permitir a total transferência do timol encapsulado para o meio de liberação considerando que as micropartículas não exerciam nenhuma restrição à solubilização e transferência completa ao meio de liberação escolhido. Os diferentes métodos de reticulação foram testados e os resultados obtidos na quantificação da liberação se encontram no anexo 1 (Tabelas 8.1 e 8.2). Vários problemas foram observados com o material de recheio escolhido: foi claramente percebida uma forte perda de timol durante o processo de preparação das micropartículas que incluía manter o sistema aquecido a 50°C para que a gelatina permanecesse líquida durante o ajuste de pH e efetiva complexação eletrostática e encapsulação do recheio; a quantificação do timol presente

inicialmente nas micropartículas antes do estudo de liberação foi problemática e os valores determinados, inferiores aos quantificados nos meios de liberação inviabilizando assim a determinação efetiva das porcentagens liberadas e finalmente as comparações entre os tratamentos reticulantes. Aparentemente, não houve diferenças na liberação com resultados indicando uma alta liberação mesmo no primeiro tempo de análise (30 minutos) que permanecia constante ao longo do tempo para todos os tratamentos estudados. Face aos problemas apresentados a escolha de outro material de recheio foi necessária. No anexo 2 (Figura 8.1) foi incluída uma seqüência de fotos da liberação do timol em um dos sistemas estudados. É possível observar que embora os resultados não tenham sido razoáveis para avaliar o efeito reticulante, pode-se claramente observar uma liberação controlada da cor nas soluções de liberação. A cor das soluções era determinada pela liberação de oleoresina de páprica-óleo de soja transferidos para a solução aquosa contendo SDS 1%. A partir desta constatação a escolha da oleoresina foi definida como novo material de recheio para a liberação.

Ainda, preliminarmente, novos problemas foram observados na preparação da curva padrão para a quantificação da oleoresina-óleo de soja livre. A solubilidade da mistura em solução aquosa de SDS foi baixa e o sistema instável com a presença de material insolúvel no meio, impossibilitando desta forma a construção da curva padrão no meio aquoso SDS 1%. Outras tentativas de mudança do meio de liberação foram feitas incluindo o etanol anidro, que funcionou muito bem como solvente para a mistura oleoresina-óleo de soja livre ou encapsulada porém considerou-se que o etanol anidro poderia provocar interferências na parede das micropartículas e inviabilizar a comparação das diferentes intensidades de reticulação e da ordem de produção das emulsões. Glicerol e triacetina foram posteriormente avaliados. O glicerol apresentou problemas de viscosidade tornando seu uso inviável como meio de liberação enquanto a triacetina foi adequada quanto à viscosidade, porém apresentou capacidade insuficiente de solubilização da mistura oleoresina de páprica-óleo de soja a ser utilizada como material de recheio, sendo ambos desconsiderados. Finalmente o óleo de girassol que apresenta baixa intensidade de cor foi testado



como alternativa. Os testes preliminares mostraram que a mistura oleoresina de páprica-óleo de soja era totalmente solúvel no mesmo, nas quantidades necessárias ao experimento, apresentava viscosidade baixa à temperatura ambiente e a varredura espectrofotométrica no UV-Visível adequada e sem interferências no comprimento de onda no qual a oleoresina seria quantificada (Anexo 4 – Espectro de varredura para oleoresina de páprica-óleo de soja solubilizada em óleo de girassol), definindo-se assim o recheio e o solvente de liberação para tentativamente avaliar os efeitos reticulantes e as ordens de preparação das emulsões na capacidade de melhorar a liberação do recheio das micropartículas.

A escolha do meio de liberação é delicada e ainda problemática na literatura. Para alguns sistemas, como micropartículas obtidas por *spray dryer* contendo óleos essenciais ou agentes de flavor hidrofóbicos é concordante a utilização da liberação no ar utilizando medidas de transferência para o *head space*, estáticas ou dinâmicas (RODRIGUES, 2004) e quantificação por cromatografia gasosa. Quando os meios de liberação são líquidos como em muitos alimentos, os fatores mais importantes são o pH do meio e sua força iônica. Outra possibilidade, de grande interesse aplicado e intensamente buscado é a possibilidade de utilização das micropartículas que sejam adequadas entericamente, ou seja, resistentes a pH muito ácidos e a enzima digestiva pepsina e por outro lado que sejam totalmente desfeitas em condições intestinais de pH neutro ou ligeiramente básico e enzimas de atuação no pH básico (pancreatina). Esta última possibilidade foi buscada para as micropartículas obtidas no presente estudo. Como os sistemas digestivos contem tensoativos naturais, vários trabalhos utilizam tensoativos para tentar simular as condições naturais, incluindo o Tween e o SDS (PRATA *et al.*, 2008). A utilização de solventes orgânicos incluindo o álcool etílico também foi utilizada (ALVIM, 2005) porém é ainda pouco aplicável a alimentos.

Uma última consideração foi necessária para efetuar os estudos de liberação: utilizar as micropartículas secas por liofilização diretamente dispersas

no óleo utilizado como meio de liberação ou reidratar-las já que as micropartículas apresentaram inchamento instantâneo em menos de 10 segundos em água (PRATA *et al.*, 2008). Considerando que a água absorvida pelas micropartículas poderia se constituir em uma barreira extremamente eficiente à difusão do recheio hidrofóbico para o óleo-meio de liberação, funcionando como um escudo protetor à difusão (DE ROOS, 2003), cápsulas liofilizadas foram peneiradas ( $\phi 25\mu\text{m}$ ) e diretamente suspensas no meio de liberação.

A quantificação da mistura oleoresina de páprica-óleo de soja foi feita espectrofotometricamente. A curva padrão de recheio livre foi preparada usando óleo de girassol como solvente (Anexo 3, Figura 8.2- Curva padrão de oleoresina de páprica em óleo de girassol). Quantificações da mistura liberada e da quantidade de recheio presente nas micropartículas liofilizadas foram feitas utilizando-se uma curva padrão. Pelo espectro UV-Visível maior absorbância foi obtida em 460 nm (Anexo 4 – Espectro de varredura para oleoresina de páprica-óleo de soja solubilizada em óleo de girassol 320-700nm). A equação linear obtida foi  $Y = 13,66X + 0,0145$ ,  $R^2 = 0,998$  (Y=absorbância e X=concentração da oleoresina em mg/mL de óleo de girassol).

### 5.5.1 Eficiência de encapsulação

As eficiências de encapsulação das micropartículas coacervadas produzidas, contendo oleoresina de páprica e óleo de soja varia entre 79,00 e 90,80% e são apresentados na Tabela 5.8.

**Tabela 5.8.** Eficiência de encapsulação (%EE), desvios padrões das micropartículas coacervadas e liofilizadas.

Tratamento	(%EE)	Tratamento	(%EE)
GEMSR	81,90±8,5	GAMSR	79,00±6,1
GEMR10U	90,80±0,4	GAMR10U	89,10±2,6
GEMR20U	84,50±2,0	GAMR20U	88,20±5,9
GEMR30U	87,70±0,5	GAMR30U	88,00±5,4
GEMR40U	89,30±2,0	GAMR40U	88,30±5,1
GEMR50U	85,00±0,50	GAMR50U	87,90±3,0
GEGLU	88,60±1,0	GAGLU	89,90±1,9

A eficiência de encapsulação em sistemas coacervados está associada a parâmetros de processo e características dos polímeros de parede e do recheio. Quando o sistema de obtenção das micropartículas está otimizado, valores superiores a 80% são geralmente observados. Prata (2006) determinou eficiências de encapsulação entre 75,6 e 95,4% para micropartículas úmidas sem reticulação e reticuladas com glutaraldeído. Alvim (2005) observou eficiências de encapsulação das micropartículas coacervadas contendo oleoresina de páprica e óleo de soja entre 96,10 e 98,30%. Eficiências de encapsulação variando entre 80 e 100% foram obtidas para micropartículas produzidas por coacervação complexa utilizando gelatina e goma arábica na encapsulação de óleo de *Cinnamomum camphora* quando a velocidade de produção da emulsão e a concentração do reticulante e o tempo de reticulação com glutaraldeído foram alterados (CHANG *et al.*, 2006).

### **5.5.2 Liberação de oleoresina de páprica de micropartículas coacervadas em óleo de girassol**

Uma vez definidas as condições necessárias para avaliar a liberação do material de recheio incluindo a não saturação do meio de liberação caso fosse possível a liberação de 100% do material encapsulado, foram efetuadas as medidas do material liberado.

Os perfis de liberação ao longo do tempo de oleoresina de páprica-óleo de soja encapsuladas em micropartículas obtidas por coacervação complexa e reticuladas com transglutaminase (10, 20, 30, 40 e 50U/g.ptn), glutaraldeído (1mM/g.ptn) e sem reticulação em óleo de girassol estão apresentadas na Tabela 5.9 e no anexo 5 (Figura 8.3) para os sistemas produzidos com a gelatina emulsificando o recheio oleoso e na Tabela 5.10 e anexo 6 (Figura 8.4) com a goma arábica emulsificando a mistura oleosa.

De forma geral é possível observar que independente da forma como a emulsão foi produzida, o aumento da reticulação enzimática foi eficiente em diminuir a liberação da oleoresina de páprica-óleo de soja no meio de liberação utilizada. Diferenças significativas foram observadas mesmo a 10U/g.ptn em relação à liberação observada para as micropartículas sem reticulação. O aumento da quantidade de enzima/g micropartícula (g de proteína) produziu em ambas as formas de preparar as emulsões, decréscimo nas quantidades liberadas sendo bastante acentuado para a maior quantidade (50U/g.ptn). Pode-se também observar que as micropartículas não reticuladas apresentaram liberação controlada nas duas formas de preparo das micropartículas estudadas com liberação máxima após 24 horas de 72,09 e 46,38% para gelatina emulsificando o recheio e goma arábica emulsificando o recheio respectivamente.

Micropartículas sem reticulação produzidas com a goma arábica emulsionando o recheio hidrofóbico e posterior adição de gelatina apresentou uma parede menos permeável a saída do recheio para o meio de liberação que a parede resultante da micropartícula produzida com gelatina emulsionando o recheio oleoso. O efeito da inversão produziu após 24 horas de liberação uma

diferença de 25,7 % entre as duas formas de preparo. A diferença foi surpreendente e não esperada.

De acordo as observações de Lamprecht *et al* (2000) utilizando microscopia confocal, as micropartículas produzidas a partir de emulsões gelatina-recheio hidrofóbico, a gelatina e a goma arábica estão homogeneamente distribuídas na parede sem indicação de maior concentração de um dos polímeros em relação ao outro. Distribuição semelhante deveria ser esperada para o sistema inverso, com a goma arábica envolvendo o recheio, considerando que o complexo eletrostático é o mesmo. No entanto as diferenças de liberação indicam melhor empacotamento e conseqüente diminuição da porosidade para micropartículas produzidas com goma arábica emulsionando o recheio e posterior adição de gelatina. Menores diferenças entre as micropartículas devido à ordem de produção da emulsão são observadas à medida que a intensidade de reticulação enzimática aumenta, ficando praticamente iguais quando 40 e 50U/g.ptn são utilizados.

Os perfis de liberação obtidos indicam, independente dos tratamentos, semelhança entre as curvas com crescimento suave nas quantidades liberadas até 24 horas estudadas.

Estudos de liberação onde o efeito do agente de reticulação foram estudados indicam que o glutaraldeído foi mais eficiente que a transglutaminase conforme observado por Prata *et al* (2008), porém utilizando menores concentrações de enzima/g de proteína (20U/g.ptn) ou por Alvim (2005) utilizando 10U/g.ptn. Menor eficiência em modificar textura de géis de miosina foi também observada para transglutaminase em relação ao glutaraldeído. A maior eficiência (KAKUGO *et al.*, 2005) do glutaraldeído pode ser devido a sua natureza polimérica que pode acessar grupos reativos separados em vários comprimentos possibilitando maior alcance dos grupos ativos susceptíveis ao *cross-linking* em comparação ao tamanho fixo da enzima (CHARULATA & RAJARAM, 2003).

Em ambos os sistemas (Tabela 5.9 e Tabela 5.10) pode-se observar que o efeito da concentração mais alta de enzima utilizada (50U/g.ptn) na intensidade de liberação foi praticamente igual, na intensidade de liberação, ao

perfil de liberação produzido pelas micropartículas reticuladas com glutaraldeído (1mM/g.ptn) quando gelatina foi emulsionada com o recheio hidrofóbico para produzir as micropartículas. Para micropartículas produzidas com goma arábica emulsionando o material de recheio, foram observadas diferenças significativas em relação a reticulação com glutaraldeído, porém os valores após 24 horas são próximos (21,7% para 50U/g.ptn e 16,3% para glutaraldeído).

Esses resultados são indicativos de que é possível a substituição do glutaraldeído, não permitido para uso alimentício, pela enzima em concentrações adequadas para maximizar o grau de reticulação. Em trabalho anterior, onde o *cross-linking* foi produzido com a mesma enzima atuando em soluções filmogênicas de gelatina, foi observado que a utilização de 10U/g.ptn produziu abaixamento na permeabilidade à água nos filmes reticulados porém somente 50% dos grupos  $\epsilon$ -amina estavam reticulados (CARVALHO & GROSSO, 2004). Posteriormente, em outro estudo com filmes de gelatina reticulados com transglutaminase foi observado que para reticular 100% dos grupos  $\epsilon$ -amina das lisinas foi necessário utilizar 50U/g.ptn. A partir desta concentração não foram observados efeitos adicionais (BERTONI *et al.*, 2006).

**Tabela 5.9.** Porcentagem de oleoresina de páprica liberada ao longo do tempo das micropartículas coacervadas, liofilizadas, reticuladas com transglutaminase (10-50U/g.ptn), glutaraldeído (1 mM/g de proteína) e sem reticulação da emulsão gelatina/oleoresina de páprica-óleo de soja, em óleo de girassol.

Tratamento	Liberação de oleoresina (%)			
	4 horas	8 horas	12 horas	24 horas
GEMSR	57,81±4,98 <sup>bA</sup>	64,26±3,16 <sup>abA</sup>	65,59±1,70 <sup>abA</sup>	72,09±1,70 <sup>aA</sup>
GEMR10U	35,87±0,84 <sup>cB</sup>	43,05±4,38 <sup>bB</sup>	57,27±3,69 <sup>aB</sup>	60,39±0,60 <sup>aB</sup>
GEMR20U	33,69±1,34 <sup>cB</sup>	38,64±4,38 <sup>bB</sup>	51,95±1,59 <sup>aC</sup>	52,28±1,48 <sup>aC</sup>
GEMR30U	33,04±0,29 <sup>dB</sup>	37,06±0,19 <sup>cB</sup>	42,45±0,22 <sup>bD</sup>	47,07±0,85 <sup>aD</sup>
GEMR40U	21,85±0,86 <sup>cC</sup>	26,61±0,89 <sup>bC</sup>	30,35±0,72 <sup>aE</sup>	31,09±1,29 <sup>aE</sup>
GEMR50U	11,83±1,42 <sup>aD</sup>	15,59±3,61 <sup>aD</sup>	15,45±0,63 <sup>aF</sup>	16,49±1,47 <sup>aF</sup>
GEGLU	11,78±0,57 <sup>bD</sup>	13,78±1,39 <sup>abD</sup>	14,18±0,77 <sup>abF</sup>	15,90±1,43 <sup>aF</sup>

Nota: letras minúsculas diferentes na mesma linha e letras maiúsculas diferentes na mesma coluna representam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as médias obtidas através do teste Tukey.

**Tabela 5.10.** Porcentagem de oleoresina de páprica liberada ao longo do tempo das micropartículas coacervadas, liofilizadas, reticuladas com transglutaminase (10-50U/g.ptn), glutaraldeído (1 mM/g de proteína) e sem reticulação da emulsão goma arábica/oleoresina de páprica-óleo de soja, em óleo de girassol.

Tratamento	Liberação de oleoresina (%)			
	4 horas	8 horas	12 horas	24 horas
GAMSR	37,74±1,50 <sup>aA</sup>	42,42±0,93 <sup>abA</sup>	43,09±2,70 <sup>aA</sup>	46,38±1,63 <sup>aA</sup>
GAMR10U	24,88±1,46 <sup>cB</sup>	31,52±2,85 <sup>bB</sup>	33,63±4,27 <sup>abB</sup>	37,38±0,91 <sup>aB</sup>
GAMR20U	25,56±0,72 <sup>cB</sup>	28,24±1,59 <sup>bcBC</sup>	31,21±0,78 <sup>abBC</sup>	32,97±0,67 <sup>aBC</sup>
GAMR30U	24,95±0,57 <sup>cB</sup>	27,57±1,71 <sup>bc</sup>	30,83±0,23 <sup>abC</sup>	32,78±0,50 <sup>aBC</sup>
GAMR40U	21,49±1,27 <sup>cC</sup>	27,25±0,82 <sup>bc</sup>	27,38±1,32 <sup>bc</sup>	30,10±2,39 <sup>aC</sup>
GAMR50U	14,91±0,44 <sup>cD</sup>	19,67±1,02 <sup>bd</sup>	20,70±1,72 <sup>abD</sup>	21,68±2,39 <sup>aD</sup>
GAGLU	10,66±1,07 <sup>bE</sup>	11,44±1,35 <sup>bE</sup>	11,80±0,61 <sup>bE</sup>	16,33±2,22 <sup>aE</sup>

Nota: letras minúsculas diferentes na mesma linha e letras maiúsculas diferentes na mesma coluna representam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as médias obtidas através do teste Tukey.

### 5.5.3 Efeito da reticulação e do tratamento das micropartículas em condições gástricas (pH ácido e pepsina) na liberação da oleoresina de páprica

Finalizados os estudos de liberação em função da intensidade de reticulação e da forma de preparação das micropartículas um novo ensaio gástrico simulando condições do estômago (pH 1,2; presença de pepsina e duas horas de digestão) foi efetuado determinando-se após a digestão, a quantidade de oleoresina de páprica-óleo de soja liberados em óleo de girassol comparando-se as duas diferentes formas de preparo da emulsão porém somente com micropartículas sem reticulação, reticuladas com o nível mais alto do reticulante enzimático (50U/g.ptn) e do reticulante químico (1mM/g.ptn) conforme pode ser observado na Tabela 5.11.



**Tabela 5.11.** Porcentagem de oleoresina de páprica liberada em condições gástricas, das micropartículas coacervadas sem reticulação, reticuladas com transglutaminase (50U/g.ptn) e glutaraldeído (1mM/g.ptn) dos dois sistemas, em óleo de girassol.

Tratamento	Liberação de oleoresina (%)	Tratamento	Liberação de oleoresina (%)
GEMSR	55,89±8,99	GAMSR	54,57±4,80
GEMR50U	33,90±4,30	GAMR50U	32,30±2,22
GEGLU	12,46±2,52	GAGLU	10,33±1,28

Nos experimentos anteriores onde as micropartículas foram avaliadas com relação à resistência a diferentes valores de pH e resistência a condições ácidas e básicas entéricas com a presença de enzimas digestivas, as micropartículas foram adicionadas liofilizadas diretamente nos meios do ensaio. Para esse ultimo teste optou-se por re-hidratar as micropartículas antes de transferi-las ao meio de ensaio entendendo-se que desta forma se alcançava maior similaridade com o que efetivamente poderia estar acontecendo em condições *in vivo*.

No estudo de liberação, diferenças grandes foram observadas em função da forma de preparo das emulsões onde micropartículas sem reticulação que foram produzidas com a goma arábica emulsionando o recheio foram mais eficientes em reter maior quantidade de recheio. No entanto estas diferenças não se mantiveram no teste gástrico (pH 1,2 e pepsina). As liberações para as micropartículas da emulsão gelatina/oleoresina de páprica-óleo de soja e da emulsão goma arábica/oleoresina de páprica-óleo de soja liberaram quantidades muito próximas, 55,9 e 54,6% respectivamente e sem diferenças significativas. A comparação da liberação de material do recheio das micropartículas da emulsão goma arábica/oleoresina de páprica-óleo de soja após 4 horas de liberação (37,7%) (Tabela 5.10) com a liberação observada no ensaio gástrico (54,6%) indicou que as micropartículas sofreram ataque enzimático.

Micropartículas reticuladas com a maior quantidade de enzima nas duas formas de preparo das emulsões também apresentaram liberação do material do recheio praticamente idênticas (33,9% para emulsão gelatina/oleoresina de páprica-óleo de soja e 32,3% goma arábica/oleoresina de páprica-óleo de soja) após serem submetidas às condições gástricas indicando que ocorreu ataque enzimático proteolítico da pepsina com alguma intensidade. Adicionalmente as liberações foram muito superiores as liberações observadas quando somente o óleo de girassol foi empregado (11,8% e 14,9%, Tabela 5.9 e Tabela 5.10 respectivamente, após 4 horas de liberação). Uma das vantagens atribuídas à reticulação com a enzima transglutaminase, além de produzir mudanças funcionais desejáveis em sistemas protéicos, é que a reticulação não inviabiliza sua posterior hidrólise entérica e aproveitamento nutricional em termos dos aminoácidos (MAHMOUD & SAVELLO, 1993).

Apesar da liberação observada depois de submetidas a condições entéricas ácidas, as micropartículas reticuladas com a maior quantidade de enzimas, independente da ordem de preparo da emulsão, ainda apresentou alta porcentagem de retenção (66 e 68%) do material de recheio encapsulado. Como observado anteriormente nos resultados, todas as micropartículas estudadas, independente da ordem de produção da emulsão, da quantidade de agente reticulante utilizado ou do tipo de reticulante, foram totalmente dissolvidas em presença de pancreatina e pH 7. Micropartículas reticuladas com glutaraldeído foram mais resistentes ao ataque enzimático gástrico com liberações variando entre 10 – 12% do total encapsulado.

## **6. CONCLUSÕES**

Micropartículas obtidas por coacervação complexa utilizando goma arábica e gelatina e posteriormente reticuladas com transglutaminase (>10U/g.ptn) ou com glutaraldeído mantiveram sua integridade em solução aquosa de dodecil sulfato de sódio (5%), após tratamento a 95°C/15 minutos, em pH ácido (1 e 2) e neutro (7) e em condições entéricas ácidas incluindo pH ácido (1,2) com adição da enzima pepsina em comparação as micropartículas não reticuladas. Todas as micropartículas, independente do grau de reticulação ou do agente reticulante, foram destruídas com liberação completa do material de recheio, quando incubadas em condições entéricas simulando condições intestinais (pH 7 com adição de pancreatina, 37°C, 4 horas).

A intensidade de reticulação influenciou a intensidade de liberação de oleoresina de páprica-óleo de soja em um meio contendo óleo de girassol. Maior reticulação produziu menor liberação e micropartículas reticuladas com 50U/g.ptn de transglutaminase apresentaram perfil de liberação muito próximo ao perfil observado para micropartículas reticuladas com glutaraldeído desta forma abrindo a possibilidade de substituição do glutaraldeído como reticulante em sistemas similares ao estudado nesse trabalho.

A seqüência como as micropartículas foram preparadas foi muito importante nos perfis de liberação do material do recheio. A utilização da goma arábica emulsionada com o recheio hidrofóbico e posterior adição de gelatina foi muito mais eficiente (liberação 25% menor) em relação à forma convencional de produção onde a gelatina é emulsificada com recheio hidrofóbico e posteriormente a goma arábica é adicionada.

As micropartículas reticuladas com a enzima transglutaminase (>10U/g.ptn) ou com glutaraldeído apresentaram caráter entérico gástrico com a presença de pepsina com a seguinte ordem em relação à eficiência de retenção do recheio; micropartículas reticuladas com glutaraldeído > micropartículas reticuladas com transglutaminase (50U/g.ptn) > micropartículas sem reticulação.

Considerando a porcentagem de oleoresina-óleo de soja liberada em relação à quantidade inicialmente presente na micropartícula esta ordem correspondem numericamente a liberações de 11%, 33% e 55% respectivamente.

As micropartículas apresentaram comportamento de resistência parcial as condições gástricas, portanto adequadas ao uso em alimentos ou fármacos, onde o material de recheio deve ser liberado no intestino.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKIN, H.; HASIRCI, N. Preparation and characterization of crooslinked gelatin microspheres. **Journal of Applied Polymer Science**, v.58, n.1, p.95-100, 1995.
- ALVIM, I.D. Produção e caracterização de microcápsulas obtidas por *spray drying* e coacervação complexa e seu uso para alimentação de larvas de peixe. Tese, UNICAMP, Campinas, São Paulo, 267p, 2005.
- ANDO, H.; ADACHI, M.; UMEDA, K.; MATSUURA, A.; NONAKA, M.; UCHIO, R.; TANAKA, H.; MOTOKI, M. Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganisms. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.53, n.10, p.2613-2617, 1989.
- ANDRES, C. Encapsulation ingredients. *Food Processing*, v.38, n.12, p.44, 1977.
- AOAC. Association of official analytical chemists official methods of analysis. 16<sup>th</sup> Ed. Washington, 1998.
- ARVANITOYANNIS, I. Formation and properties of collagen and gelatin films and coating. In: GENNADIOS, A. (Ed.). Protein-based films and coating. New York: CRC Press, Boca Raton, Cap.11, p.275-304, 2002.
- ARSHADY, R. Microcapsules for food. **Journal of Microencapsulation**, v.10, n.4, p.413-435, 1993.
- AYDIN, S.; BASARAN, A.A.; BASARAN N.; The effects of thyme volatiles on the induction of DNA damage by the heterocyclic amine IQ and mitomycin C. **Mutation Research**, v.518, p.43-53, 2005.
- BABIN, H.; DICKSON, E. Influence of transglutaminase treatment on the thermoreversible gelation of gelatin. **Food Hydrocolloide**, v.15, n.3, p.271-276, 2001.
- BAKAN, J.A. Microencapsulation of foods and related products. **Food Technology**. Chicago, p.34-44, 1973.

- BEATUS, Y.; RAZIEL, A.; ROSENBERG, M.; KOPELMAN, I.J. Spray-drying microencapsulation of paprika oleoresin. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, v.18, p.28-34, 1985.
- BEMILLER J.N.; WHISTLER, R.L. Carbohydrates. In: Fennema, O.R. (Ed.), **Food Chemistry**, 3<sup>rd</sup> Ed., Marcel Dekker, New York, 1996.
- BERMEJO, P.; PEÑA, E.M.; DOMÍNGUEZ, R.; BERMEJO, A.; COCHO, J.A.; FRAGA, J.M. Iron and zinc in hydrolysed fractions of human milk and infant formulas using an in vitro method. **Food Chemistry**, v.77, p.361-369, 2002.
- BERTONI, F.; BARBANI, N.; GIUSTI, P.; CIARDELLI, G. Transglutaminase reactivity with gelatin: Perspective applications in tissue. **Engineering. Biotechnology Letters**, v.28, n.10, p.697-702. 2006.
- BIACS, P.A.; CZINKOTAI, B.; HOSCHKE, A. Factors affecting stability of colored substances in paprika powders. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.40, n.30, p.363-367, 1992.
- BIGI, A.; COJAZZI, G.; PANZAVOLTA, S.; RUBINI, K.; ROVERI, N. Mechanical and thermal properties of gelatin films at different degrees of glutaraldehyde crosslinking. **Biomaterials**, v.22, n.8, p.763-768, 2001.
- BÖNISCH M.; HUSS M.; WEITL K.; KULOZIK U. Transglutaminase cross-linking of milk proteins and impact on yoghurt gel properties. **International Dairy Journal**, v.17, p. 1360-1371, 2007.
- BORGES, P.; PINO, J.A.; FERNANDEZ, N. Obtención de oleoresina de pimentón dulce. Evaluación de solventes de extracción. *Alimentaria*, p.59-60, 1997.
- BRANON-PEPPAS, L. Controlled release in the food and cosmetics industries. *ACS Symposium*, p.42-52, 1993.
- BRAGA, P.C.; DAL SASSO, M.; CULICI, M.; BIANCHI, T.; BORDONI, L.; MARABINI, L. Anti-inflammatory activity of thymol: Inhibitory effect on

- the release of human neutrophil elastase. **Pharmacology**. v.77, p.130-136, 2006.
- BUFFO, R.A.; REINECCIUS, G.A.; OEHLERT, G.W. Factors affecting the emulsifying and rheological properties of gum acacia in beverage emulsions. **Food Hydrocolloids**, v.15, n.1, p.53-66, 2001.
- BUNGERBERG DE JONG, H.G. Complex colloid systems, In: Colloid Science, vol. II, KRUYF, H. R. Ed., Elsevier New York, Chapter VIII and X, 1949.
- BURGESS, D.J.; PONSART, S.  $\beta$ -glucuronidase activity following complex coacervation and spray drying microencapsulation. **Journal of Microencapsulation**, v.15, n.5, p.569-579, 1998.
- BURGESS, D.J. Practical analysis of complex coacervate systems. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.140, n.11, p.227-238, 1990.
- BURGESS, D.J.; CARLESS, J.E. Microelectrophoretic studies of gelatin and acacia for the prediction of complex coacervation. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 98, n.1, p.1-8, 1984.
- BUROVA, T.V.; GRINBERG, N.V.; GRINBERG, V.Y.; LEONTIEV, A.L.; TOLSTOGUZOV, V.B. Effects of polysaccharides upon the functional properties of 11-s globulin of broad beans. **Carbohydrate Polymers**, v.18, n.2, p.101-108, 1992.
- CARDOSO, F.S.N. Produção de microcápsulas de amido com recobrimento em leite fluidizado. Dissertação. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2000, 65p.
- CARVALHO, R.A.; GROSSO, C.R.F. Characterization of gelatin-based films modified with transglutaminase, glyoxal and formaldehyde. **Food Hydrocolloids**, v.18, n.5, p.717-726, 2004.
- CARVALHO, R. A. Elaboração e caracterização de filmes a base de gelatina modificada enzimática e quimicamente. Tese – Universidade Estadual

- de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, SP, 227p, 2002.
- CHANG, C.P.; LEUNG, T.K.; LIN, C.C.; HSU, C.C. Release properties on gelatin – gum arabic microcapsules containing camphor oil with added polystyrene. **Colloid and surfaces B: Biointerfaces**, v.50, n.2, p.136-140, 2006.
- CHAMBI, H.; GROSSO, C.R.F. Edible films produced with gelatin and casein cross-linked with transglutaminase. **Food Research International**, v.39, n.4, p.458-466, 2006.
- CHAMPAGNE, C.P.; CÔTÉ, C.B. Cream fermentation by immobilized lactic acid bacteria. **Biotechnology Letters**, London, v.9, n.5, p.329-332, 1987.
- CHARULATA, V.; RAJARAM, A. Influence of different cross-linking treatments on the physical properties of collagen membranes. **Biomaterials**, v.24, n.5, p.759-767, 2003.
- CHOI, S.S.; REGENSTEIN J. M. Physicochemical and sensory characteristics of fish gelatin. **Journal of Food Science**, v.65, p.194-199, 2000.
- CUI, J.H.; GOH, J.S.; KIM, P.H.; LEE, B.J. Survival and stability of bifidobacteria loaded in alginate poly-L-lysine microparticles. **International Journal of Pharmaceuticals**, Amsterdam, v.210, n.1-2, p.51-59, 2000.
- DE ROOS, K.B. Effect of texture and microstructure on flavor retention and release. **International Dairy Journal**, v.13, n.8, p.593-605. 2003.
- DESAI, J.D.; BANAT, I.M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.61, n.1, p.47-64. 1997.
- DHAR, K.L.; THAPPA, R.K.; AGRAWAL, S.G. Recent trends in flavour evaluation of species. In *Newer Trends in Essential Oils and Flavours*, p.153-173, Tata McGraw-Hill, New Delhi. 1993.



- DICKINSON, E.; PAWLOWSKI, K. Effect of i-carrageenan on flocculation, creaming, and rheology of a protein-stabilized emulsion. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.45, p. 3799-3806, 1997.
- DICKINSON, E. Enzymic crosslinking as a tool for food colloid rheology control and interfacial stabilization, **Trends in Food Science & Technology**, v.8, n.10, p.334-339, 1997.
- DICKINSON, E. Stability and rheological implications of electrostatic milk protein-polysaccharide interactions. **Trends in Food Science & Technology**, v.9, n.10, p.347-354, 1998.
- DINAKAR, P.; MISTRY, V.V. Growth and viability of *Bifidobacterium bifidum* in cheddar cheese. **Journal of Dairy Science, Champaign**, v.77, n.10, p.2854-2864, 1994.
- DONG, Z.J.; XIA, S.Q.; HUA, S.; HAYAT, K.; ZHANG, X.M., and XU, S.Y. Optimization of cross-linking parameters during production of transglutaminase-hardened spherical multinuclear microcapsules by complex coacervation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.63, n.1, p.41-47, 2008.
- DZIEZAK, J.D. Microencapsulation and encapsulated ingredients. **Food Technology**, v. 42, n.4, p.136-151, 1988.
- FAVARO-TRINIDADE, C.S.; GROSSO, C.R.F. The effect of the immobilization of *Lactobacillus acidophilus* & *Bifidobacterium lactis* in alginate on their tolerance to gastrointestinal secretions. **Milchwissenschaft, Kempten**, v.55, n.9, p.496-499, 2000.
- FAVARO-TRINIDADE, C.S.; GROSSO, C.R.F. Microencapsulation of *L. acidophilus*(La-05) & *B. Lactis* (Bb-12) and evaluation of their survival at the pH values of the stomach and bile. **Journal of Microencapsulation**, v.19, n.4, p.485-494, 2002.

- FLANAGAN, J.; SINGH, H. Conjugation of sodium caseinate and gum Arabic catalized by transglutaminase. **Journal of Agricultural of Food Chemistry**, v.54, n.19, p.7305-7310, 2006.
- FRAENKEL-CONRAT, H.; BRANDON, B.A.; OLCOTT, H.S. The reaction of formaldehyde proteins: Cross-linking of amino groups with phenol, imidazole, or indole groups. **Journal of Biological Chemistry**, v.174, n.3, p. 827-843, 1947.
- FEENEY, R.E.; WHITAKER, J.R. Chemical modifications of proteins. **Journal of The American Oil Chemists Society**, v.61, n.4, p.644-644, 1984.
- GALAZKA, V.B.; SMITH, D.; LEDWARD, D.A.; DICKINSON, E. Complexes of bovine serum albumin with sulfated polysaccharides: effects of pH, ionic strength and high pressure treatment. **Food Chemistry**, v.64, p.303-310, 1999.
- GALLIETA, G.; DI GIOIA, L.; GUILBERT, S.; CUQ, B. Mechanical and thermodynamical properties of films based on whey protein as affected by plasticizer and crosslinking agents. **Journal Dairy Science**, v.81, p.3123-3130, 1998.
- GAUTAM, J.; SCHOTT, H. Interaction of anionic compounds with gelatin .2. Effect on some physicochemical properties of gelatin. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.83, n.3, p.316-321, 1994.
- GERRARD J.A.; SUTTON K.H. Addition of transglutaminase to cereal products may generate the epitope responsible for coeliac disease. **Trends in Food Science & Technology**, v.16, p.510-512, 2005.
- GERRARD, J.A. Protein-protein crosslinking in food: methods, consequences and applications. **Trends in Food Science A: Technology**, v.13, p.391-399, 2002.

- GIBBS, B.F.; KERMASHA, S.; ALLI, I.; MULIGAN, C.N. Encapsulation in the food industry: a review. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v.50, n.3, p.213-224, 1999.
- GIESE, J. Packaging, storage, and delivery of ingredients. **Food Technology**, v.47, n.8, p.54-63, 1993.
- GIMÉNEZ, J.L.; LLORENTE, S.; ROMOJARO, F. Degradación del color durante almacenamiento del pimiento (*Capsicum annuum*, L.) deshidratado y de diversas calidades de pimentón. **Agroquímica Tecnología Alimentaria**, v.24, n.1, p.105-113, 1984.
- GÓMEZ-LADRÓN DE GUEVARA, R.; PARDO-GONZÁLES, J.E.; VARÓN-CASTELLANOS, R.; NAVARRO-ALBALADEJO, F. Evolution of color during the ripening of select varieties of paprika pepper (*Capsicum annuum* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.44, p.2049-2052, 1996.
- GOUIN, S. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. **Trends in Food Science & Technology**. London, v.15, n.7-8, p. 330-347, 2004.
- GREEN, N.S.; REISLER, E.; HOUK, K.N. Quantitative evaluation of the lengths of homobifunctional protein cross-linking reagents used as molecular rulers. **Protein Science**, v.10, n.7, p.1293-1304, 2001.
- GUADAYOL, J.M.; CAIXACH, J.; RIBE, J.; CABANAS, J.; RIVERA, J. Extraction, separation and identification of volatile organic compounds from Paprika oleoresin (Spanish type). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.45, p. 1868-1872, 1997.
- HANSEN, L.T.; WONJTAS, A.P.M.; JIW, Y.L.; PAULSON, A.T. Survival of Ca-alginate microencapsulated *Bifidobacterium* spp. In: milk and simulated gastrointestinal conditions. **Food Microbiology**, London, v.19, n.1, p.35-45, 2002.

- HANSEN, C. Corantes naturais. *Engenharia de Alimentos*, v.14, p.34-36, 1997.
- HERNANDEZ-MUÑOZ, P.; VILLALOBOS, R.; CHIRALT, A. Effect of cross-linking using aldehydes on properties of gluten in-rich films. **Food Hydrocolloids**, v.18, p. 403-411, 2004.
- HIEMENZ, P.C; RAJAGOPALAN, R. Principles of colloid and surface science 3<sup>rd</sup> Edition, Marcel Dekker: New York, 1997, 670p.
- HOMBREIRO-PEREZ, M.; SIEPMANN, J.; ZINUTTI, C.; LAMPRECHT, A.; UBRICH, N.; HOFFMAN, M.; BODMEIER, R.; MAINCENT, P. Nondegradable microparticles containing a hydrophilic and/or a lipophilic drug: preparation, characterization and drug release modeling. **Journal of Controlled Release**, v.88, n.3, p.413-428, 2003.
- HUPPERTZ, T.; DE KRUIFF C.G. Ethanol stability of casein micelles cross-linked with transglutaminase. **International Dairy Journal**, v.17, p.436-441, 2007.
- IJICHI, K.; YOSHIZAWA, H.; UEMURA, Y.; HATATE, Y. Multi-layered gelatin/acacia microcapsules by complex coacervation. **Journal of Chemical Engineering of Japan**, v.30, n.5, p.793-798, 1997.
- IMESON, A.P.; LEDWARD, D.A.; MITCHELL, J.R. On the nature of the interaction between some anionic polysaccharides and proteins. **Journal Science of Food Agricultural**, v.28, p.661-667, 1997.
- INOUE, S.; KAWAI, H.; KANBE, S.; SAEKI, T.; SHIMODA, T. High-resolution microencapsulated electrophoretic display (EPD) driven by poly-Si TFTs with four-level grayscale. **IEEE Transactions on Electron Devices**, v.49, n.8, p.1532–1539, 2002.
- INTAWONGSE, M.; DEAN, J.R. *In-vitro* testing for assessing oral bioaccessibility of trace metals in soil and food samples. **Trends in Analytical Chemistry**, v.25, n.9, p.876-886, 2006.

- ISLAM, A.M.; PHILLIPS, G.O.; SLJIVO, A.; SNOWDEN, M.J.; WILLIAMS, P. A. A review of recent developments on the regulatory, structural and functional aspects of gum Arabic. **Food Hydrocolloids**, v.11, n.4, p.493-505, 1997.
- JACKSON, L.S.; LEE, K. Microencapsulation and the food industry. *Lebensmittel – Wissenschaft*. **Technologic Food Science & Technology**, v.24, p.289–297, 1991.
- JANOVSKY, C. Encapsulated ingredients for the baking industry. **Cereal Food World**, Saint Paul, v.38, n.2, p.85-87, 1993.
- JEGAT, C.; TAVERDET, J.L. Microencapsulation par coacervation complexe: Influence de certains parametres sur la morphologie des particules. *Annales des Falsifications de l'Expertise Chimique*, v.94, p.103–113, 2001.
- JEGAT, C.; TAVERDET, J.L. Stirring speed influence study on the microencapsulation process and on the drug release from microcapsules. **Polymer Bulletin**, v. 44, p.345–351, 2000.
- JIANG Y.; TANG C.H.; WEN QB.; LI L.; YANG X.Q. Effect of processing parameters on the properties of transglutaminase-treated soy protein isolate films. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v.8, p.218–225, 2007.
- JIZOMOTO, H.; KANAOKA, E.; SUGITA, K.; HIRANO, K. Gelatin-Acacia microcapsules for trapping micro oil droplets containing lipophilic dugs and ready disintegration in the gastrointestinal tract. **Pharmaceutical Research**, v.10, n.8, p.1115-1122, 1993.
- JONES, M. N. Biochemical Thermodynamics, **Elsevier Science Publishers**, 2nd Ed., p.221, 1988.

- KAILASAPATHY, K. Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect and the sensory properties of yoghurt. **LWT – Food Science and Technology**, London, v.39, n.10, p.1221-1227, 2006.
- KAKUGO, A.; SUGIMOTO, K.; SHIKINAKA K., GONG J.P.; OSADA, Y. Characteristics of chemically crosslinked myosin gels. **Journal Biomaterials**, v.16, p.203-218. 2005.
- KELLY, R.; GUDO, E.S.; MITCHELL, J.R.; HARDING, S.E. Some observations on the nature of heated mixtures of bovine serum albumin with alginate and pectin. **Carbohydrate Polymer**, v.23, p.115-120, 1994.
- KHALIL, A.H.; MANSOUR, E.H. Alginate encapsulation bifidobacteria survival in mayonnaise. **Journal of Food science**, Chicago, v. 63, n. 4, 702-705, 1998.
- KENYON, M.M. Modified starch, maltodextrin, and corn syrup solids as wall materials for food encapsulation. In: Encapsulation and Controlled Release of Food Ingredients (edited by S.J. Risch & G.A. Reineccius). Pp. 43–50. ASC Symposium Series 590. Washington, DC: **American Chemical Society**. 1995.
- KIRBY, C.J.; WHITTLE, C.J.; RIGBY, N.; COXON, D.T.; LAW, B.A. Stabilization of ascorbic acid by microencapsulation in liposomes. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 26, p.437–449, 1991.
- KIM, H.S.; KAMARA, B.J.; GOOD, I.C.; ENDERS Jr., G.L. Method for the preparation of stable microencapsulated lactic acid bacteria. **Journal of Industrial Microbiology**, v.3, p.253-257, 1988.
- KRUIF, C.G.; WEINBRECK, F.; VRIES R. Complex coacervation of proteins and anionic polysaccharides. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v.9, p.340-349, 2004.
- LAMPRECHT, A.; SCHAFFER, U.F.; LEHR, C.M. Influences of process parameters on preparation of microparticle used as a carrier system for U – 3

- unsaturated fatty acid ethyl esters used in supplementary nutrition. **Journal of Microencapsulation**, v.18, n.3, p.347-357, 2001.
- LAMPRECHT, A.; SCHAFER, U.F.; LEHR, C.M. Characterization of microcapsules by confocal laser scanning microscopy; structure, capsule wall composition and encapsulation rate. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.49, p1-9, 2000.
- LE HÉNAFF, S. Microparticules de complexes de protéines de lactosérum et de xanthane comme substitut de matière grasse [Msc thesis]. Québec Canadá. Université Laval. 92 p. 1996.
- LEE, S.J.; ROSENBERG, M. Preparation and properties of glutaraldehyde cross-linked whey protein-based microcapsules containing theophylline **Journal of Controlled Release**, v.61, p.123 –136. 1999.
- LEUENBERGER, B.H. Investigation of viscosity and gelation properties of different mammalian and fish gelatins. **Food Hydrocolloids**, v.5, p.353-361, 1991.
- LIM, L.T.; MINE, Y.; TUNG, M.A. Barrier and tensile properties of transglutaminase cross-linked gelatin films affected by relative humidity, temperature, and glycerol content. **Journal of Food Science**, v.64, n.4, p.616-622, 1999.
- MAHMOUD, R.; SAVELLO, I. Solubility and hydrolyzability of films produced by transglutaminase catalytic crosslinking of whey protein. **International Dairy Science**, v.76, p.29-35, 1993.
- MENGER, F.M.; SYKES, B.M. Anatomy of coacervate. **Langmuir**, v.14, n.15, p.4131-4137, 1998.
- MATEO, C.; ABIAN, O.; BERNEDO, M.; CUENCA, E.; FUENTES, M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; PALOMO, J.M.; GRAZU, J.; PESSELA, B.C.C.; GIACOMINI, C.; IRAZOQUI, G.; VILLARINO, A.; OVSEJEVI, K.; BATISTA-VIERA, F.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUISAN, J.M. Some special features of glyoxyl supports to immobilize proteins. **Enzyme and Microbial Technology**, v.37, n.4, p.456-462, 2005.

- MARCOA, C.; ROSELL, M. R. Effect of different protein isolates and transglutaminase on rice flour properties. **Journal of Food Engineering**, v.84, n.1, p.132-139, 2008.
- MATHEIS, G.; WHITAKER, J.R., A review: enzymatic *crosslinking* of proteins applicable to foods. **Journal of Food Biochemistry**, v.11, n.4, p.309-327, 1987.
- MENGER, F.M.; PERESYPKIN, A.V.; CARAN, K.L.; APKARIAN, R.P.A. Sponge morphology in an elementary coacervate. **Langmuir**, v.16, p.9113-9116, 2000.
- MILES, C.A.; AVERY, N.C.; RODIN, V.V.; BAYLEY, A.J. The increase in denaturation temperature following cross-linking of collagen is caused by dehydration of the fibers. **Journal of Molecular Biology**, v. 346, p.551-556, 2005.
- MÍNGUEZ-MOSQUERA, M. I.; JAREN-GALAN, M.; GARRIDO FERNANDEZ, J. Color quality in paprika. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.40, p. 2348-2388, 1992.
- MOURTZINOS, N.; KALOGEROPOULOS, S.E.; PAPADAKIS, K.; KONSTANTINOOU, K.; KARATHANOS, V T. Encapsulation of nutraceutical monoterpenes in  $\beta$ -ciclodextrina and modified starch. **Journal of Food Science**, v.73, n.1, p.89-94, 2008.
- MODLER, H.W., VILLA-GARCIA, L. The growth of *Bifidobacterium longum* in a whey-based medium and viability of this organism in frozen yogurt with low and high levels of developed acidity. **Culture Dairy Products Journal**, Washington, v. 28, n.3, p.4-8, 1993.
- MONTERO, P.; GOMÉZ-GUILLÉN, M.C. Extracting conditions for megrin (*Lepidorhombus bosci*) skin collagen affect functional properties of the resulting gelatin. **Journal of Food Science**, v.65, n.3, p.434-438, 2000.



- MOTOKI, M.; SEGURO, K. Transglutaminase and its use for food processing. **Trends in Food Science & Technology**, v.9, n.5, p.204-210, 1998.
- MOTOKI, M.; ASO, H.; SEGURO, K. and NIO, N.  $\alpha$ -S1-casein film prepared using transglutaminase. **Agriculture and Biological Chemistry**, v.51, p.993-996, 1987.
- MORR, C.V.; HA, E.Y. Whey protein concentrates and isolates: processing and functional properties. **Critical Reviews Food Science and Nutrition**, v.33, n.6, p.431-476, 1993.
- MYLLÄRINEN, J.; BUCHERT, K.; AUTIO, K. Effect of transglutaminase on rheological properties and microstructure of chemically acidified sodium caseinate gels. **International Dairy Journal**, v.17, n.7, p.800-807, 2005.
- MUKAI-CORRÊA, R. Preparo e caracterização de microcápsulas obtidas por polimerização iônica para alimentação de larvas de peixe. Dissertação. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2003, 173p.
- NAVARRO, F.; COSTA, J. Evaluación del color de pimenton por colorimetria de triestimulos. **Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos**, v.33, n. 4, p.427-434, 1993.
- OH, J.H.; WANG, B.; FIELD, P.D.; AGLAN, H.A. Characteristics of edible films made from dairy proteins and zein hydrolysates crooslinked with transglutaminase. **International Journal of Food Science and Technology**, v.39, p.287-294, 2004.
- OSMAN, M.E., WILLIAMS, P.A., MENZIES, A.R.; PHILLIPS, G.O. Characterization of commercial samples of gum Arabic. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.41, p.71-77, 1993.
- OSUNA-GARCIA, J.A.; WALE, M.M.; WADDELL, C.A. Natural antioxidants for preventing color loss in stored paprika. **Journal of Food Science**, v.62, n.5, p.1017-1021, 1997.

- PEDROZA-ISLAS, R. Alimentos encapsulados: particularidades de los procesos para la microencapsulación de alimentos para larvas de especies acuicolas. In: Cruz-Suárez, L.E. *et al.* **Avances en Nutrición Acuícola** v.1, p.438-447, 2002.
- PEPPAS, N.A.; BRANNON-PEPPAS, L. Controlled release of fragrances from polymers I. Thermodynamic analysis. **Journal of Controlled Release**, v.40, p.245-250, 1996.
- POPPE, J. Gelatin. In: IMESON, A. (Ed). Thickening and gelling agents for food. 2° ed. London Blackie Academic and Professional, Cap.7, p.144-179, 1997.
- PRATA, A.S.; ZANIN, H.A.; RE, M.I.; GROSSO, C.R.F. Release properties of chemical and enzymatic crosslinked gelating-gum Arabic microparticles containing a fluorescent probe plus vetiver oil. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.67, p.171-178, 2008.
- PRATA, A.S. Estudo dos parâmetros físico-químico envolvidos na formação de microcápsulas produzidas por coacervação complexa. Tese, UNICAMP, Campinas, São Paulo, 2006, 267p.
- PRAKASH, A.J.M.; MANGINO, M.E. The effects of added proteins on the functionality of gum arabic in soft drink emulsion systems. **Food Hydrocolloids**, v.4, n.3, p.177-187, 1990.
- RADEK, J.T.; JEONG, J.M.; MURTHY, S.N.; INGHAM, K.C.; LORAND, L. Affinity of human erythrocyte transglutaminase for a 42-kDa gelatin-binding fragment of human plasma fibronectin. **Proceedings of the National Academy Sciences**, USA, v.90, n.8, p.3152-3156, 1993.
- RANDALL, R.C.; PHILLIPS, G.O.; WILLIAMS, P.A. The role of the proteinaceous component on the emulsifying properties of gum arabic. **Food Hydrocolloid**, v.2, p.131-140, 1988.
- RAO, A.V.; SHIWNARAIN, N.; MAHARAJ, I. Survival of microencapsulated *Bifidobacterium pseudolongum* simulated gastric and intestinal juices.

- Canadian Institute of Food Science and Technology Journal**, Ottawa, v.22, n.4, p.345-349, 1989.
- RAY-NENG, C.; HSIU-O, H.; MING-THAU, S. Characterization of collagen matrices crosslinked using microbial transglutaminase. **Biomaterials**, v.26, p.4229–4235, 2005.
- RÉ, M.I. Microencapsulação em busca de produtos inteligentes. Último acesso em 28/11/2003. <http://www2.uol.com.br/cienciahoje/chmais/pass/ch162/microcap.pdf>
- RÉ, M.I. Microencapsulation by spray drying. **Drying Technology**, v.16, n.6, p.1195-1236, 1998.
- RENARD, D.; ROBERT, P.; LAVENANT, L.; MELCIN, D.; POPINEAU, Y; GUEGUEN, J.; DUCLAIR, C., NAKACHE, E.; SANCHEZ, C.;SCHMITT, C. Biopolymeric colloidal carriers for encapsulation or controlled release applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v.242, n.1-2, p.163-166, 2002.
- ROBLEDO, S.; OSORIO, E; MUNOZ, D.; JARAMILLO, L.M.; RESTREPO, A.; ARANGO, G.; VÉLEZ, I. In vitro and vivo cytotoxicities and antileishmanial activities of thymol and hemisynthetic derivatives. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.49, n.4, p.1652-1655, 2004.
- RODRÍGUES, R.A. Preparo, Caracterização e avaliação funcional de microcápsulas obtidas por *spray drying*, contendo extrato de café crioconcentrado. Tese, UNICAMP, Campinas, São Paulo, 2004, 258p.
- ROLINSON, D.S. Bioquímica y valor nutritivo de los alimentos. Zaragoza, Ed. Acribia S.A., 1991.
- SANCHEZ, C.; RENARD, D; ROBERT, P.; SCHMITT, C.; LEFEBVRE, J. Structure and rheological properties of acacia gum dispersions. **Food Hydrocolloids**, v.16, p.257-267, 2002.

- SANTOS, A.B.; FERREYRA, V.P.; GROSSO, C. R. F. Microcápsulas: uma alternativa viável. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, ano 3, n.16, p.26-30, 2001.
- SCHMITT, C.; SANCHEZ, C.; DESOBRY-BANON, S.; HARDY, J. Structure and technofunctional properties of protein-polysaccharide complexes: A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.38, n.8, p.689-753, 1998.
- SCHROOYEN, P.M.M.; VAN DER MEER, R.; DE KRUIF, C.G. Microencapsulation: its application in nutrition. **Proceeding of the Nutrition Society**, v.60, p.475-479, 2001.
- SCHWARTEZBERG, G.H.; RAO, M.A. Biotechnology and Food Process Engineering. Marcel Dekker, New York, 1990.
- SEEBOTH, A.; WUSTNECK, R.; OTTO, K. The Influence of surfactants on the structure of transparent gelatin films. **Colloid and Polymer Science**, v.268, n.3, p.286-289, 1990.
- SEMENOVA, M.G. Factor determining the character of biopolymer-biopolymer interactions in multicomponent aqueous solutions modeling food systems. In **Macromolecular Interactions in Food Technology**, ACS Symposium Series 650: Washington DC, pp.37-49, 1996.
- SHAHIDI, F.; HAN, X.Q. Encapsulation of food ingredients. **Critical review in food science and nutrition**, v.33, n.6, p.501-547, 1993.
- SHEU, T.Y.; MARSHAL, R.T.; HEYMANN, H. Improving survival of culture bacteria in frozen desserts by microentrapment. **Journal Dairy Science**, v.76, n.7, p. 1902-1907, 1993.
- SHIGA, H.; YOSHII, H.; NISHIYAMA, T. Flavor encapsulation and release characteristics of spray-dried powder by the blended encapsulante of cyclodextrin and gum Arabic. **Drying Technology**, v.19, p.1385–1395. 2001.

- SINGH, O.N.; BURGESS, D.J. Characterization of albumin-alginic acid complex coacervation. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.41, p.670-673, 1989.
- SINKO, P; KOHN, J. Polymeric drug delivery systems: An Overview. Cap 2 In. Polymeric Delivery Systems: Properties and Applications.p.18-41. El-Nokaly, M.A., Piatt, D.M.; Charpentier, B.A.American Chemical Society, Washington, 1993.
- SPARKS, R.E. Microencapsulation. In "Encyclopedia of Chemical Technology" ed. Kirk-Othmer. 3<sup>rd</sup> ed. v.15, p.470. John Wiley and Sons, Inc., New York, 1981.
- SOVILJ, V. Conductometric and potentiometric investigations of ionic surfactant-gelatin interaction. **Colloid and Polymer Science**, v.276, n.4, p.328-334, 1998.
- SOVILJ, V.; DJAKOVIC, L.; DOKIC, P. Influence of surfactant-protein interaction on the wall structure of microcapsules. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.158, n.2, p.483-487, 1993.
- STAINSBY, G. Proteinaceous gelling systems and their complexes with polysaccharides. **Food Chemistry**, v.6, p.3-14, 1980.
- STRAUSS, G.; GIBSON, S.M. Plant phenolics as cross-linkers of gelatin gels and gelatin-based coacervates for use as food ingredients. **Food Hydrocolloids**, v.18, p.81-89, 2004.
- SULTANA, K.; GODWARD, G.; REYNOLDS, N. Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. **International Journal of Food Microbiology**, Richmond, v.62, n.1-2, p.47-55, 2000.
- TAN, C. Beverage Emulsions in: Food Emulsions, Second Edition, Eds. K. Larsson and S.E. Friberg, New York: Marcel Dekker, p.445 – 478, 1990.

- TANG, C.H.; JIANG, Y.; WEN, Q.B.; YANG, X.Q. Effect of transglutaminase treatment on the properties of cast films of soy protein isolates. **Journal of Biotechnology**, v.120, n.3, p. 296–307, 2005.
- THIES, C. Chapter 5. Complex coacervation. How to make Microcapsules Lecture and Laboratory Manual. Sant Louis: Thies technology, 1995.
- TODD, E.C. New extraction process improves. **Food Engineering**, p.82-84, 1957.
- TOLSTOGUZOV, V. Some thermodynamic considerations in food formulation. **Food Hydrocolloids**, v.17, p.1-23, 2003.
- TOLSTOGUZOV, V. Thermodynamic considerations in food formulation. **Food Hydrocollodois**, v.17, p.181-193, 1997.
- TOLSTOGUZOV, V. Structure-property relationships in foods. In *Macromolecular interactions in food technology*, Parris, N., Kato, A., Creamer, L. K., Pierce, J., Eds.; ACS Symposium Series 650; American Chemical Society: Washington DC, pp 2-14, 1996.
- TURGEOSU, S.L.; BEALIEV, M.; SCHMITT, C.; SANHEZ, C. Protein-polysaccharide interactions: phase ordering kinetics thermodynamic and structural aspects, current opinion in colloid and interface science. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v.8, n.4-5, p.401-414, 2003.
- VANDEVELDE, M.C., FENYO, J.C. Macromolecular distribution of Acacia-Senegal gum (Gum Arabic) by size-exclusion chromatography. **Carbohydrate Polymers**, v.5, n.4, p.251-273, 1985.
- VANDERGAER, J.E. Encapsulation by coacervation in: Microencapsulation: processes and applications. VANDERGAER, J.E. ed. Plenun Press, New York, p.1-20, 1974.
- VARÓN-CASTELLANOS, R.; NAVARRO-ALBALADEJO, F. Evolution of color during the ripening of select varieties of paprika pepper (*Capsicum*

- annum* L.). **Journal Agricultural Food Chemistry**, v.44 p.2049-2052, 1996.
- VEIS, A.; ARANYI, C. Phase separation in polyelectrolyte systems. I. Complex coacervates of gelatin. **Journal of Physical Chemistry**, v.64, p.1203-1210, 1960.
- VERNON-CARTER, E.J. Stability of *Capsicum annuum* oleoresin-in-water emulsions containing Prosopis and Acacia gums. **Journal of Texture Studies**, v.29, n.5, p.553-567, 1998.
- VERSIC, R. J. Coacervation for flavor encapsulation in J. RISCH, G.A. REINECCIUS (Eds.). **Flavor Encapsulation**. 1<sup>st</sup> Ed. American Chemical Society, Washington, D.C. ACS Symposium Series 370, p.126-131, 1988.
- WANG, Y.; MO, X.; SUN-SUSAN, X.; WANG, D. Soy protein adhesion enhanced by glutaraldehyde crosslinking. **Journal of Applied Polymer Science**, v.104, p.130-136, 2007.
- WANG D.W. & ZHAO X.P. Microencapsulated electric ink using gelatin/gum Arabic. **Journal of Microencapsulation**, v.7, 2008.
- WEINBRECK, F.; WEINTJES, R.H.W.; NIEUWENHUIJSE, H.; ROBIJN, G.W.; DE KRUIF, C.G. Reological properties of whey protein/gum Arabic coacervates, **Journal of Rheology**, v.48, n.6, p.1215-1228, 2004.
- WINNING, M. Microencapsulated colours –Natural colours – with improved stability. **Agro Food Industry Hi Tech**, v.6, n. 5, p.13-15, 1995.
- XING, F., CHENG, G., YANG B., MA, L. Microencapsulation of capsaicin by the complex coacervation of gelatin, acacia and tannins. **Journal of Applied Polymer Science**, v.91, p.2669 – 2675, 2004.
- ZHU, Y.; RINZEMA, A.; TRAMPER, J.; BOT, J. Microbial transglutaminase- a review of its production and application in food processing. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.44, p.277-282, 1995.

ZUCKERKANDL, E. The appearance of new structures in proteins during evolution. **Journal of Molecular Evolution**, v.7, p.1-57, 1975.



## 8. ANEXOS

### 8.1 Anexo 1 – Liberação de timol das micropartículas coacervadas em solução aquosa de SDS 1%

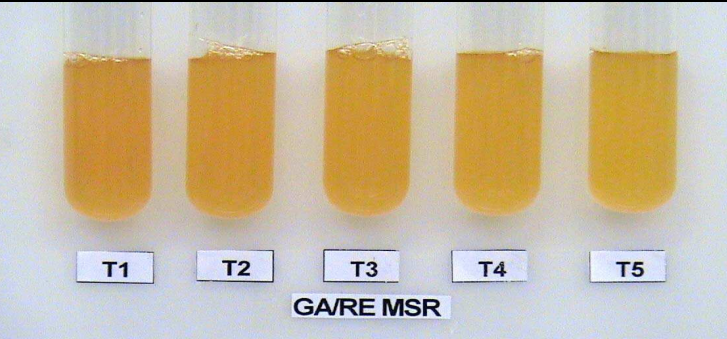
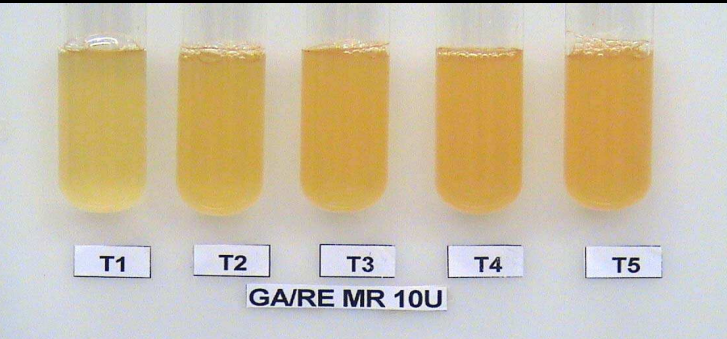
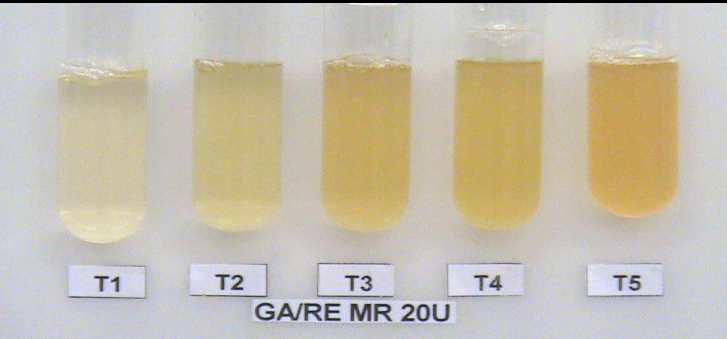
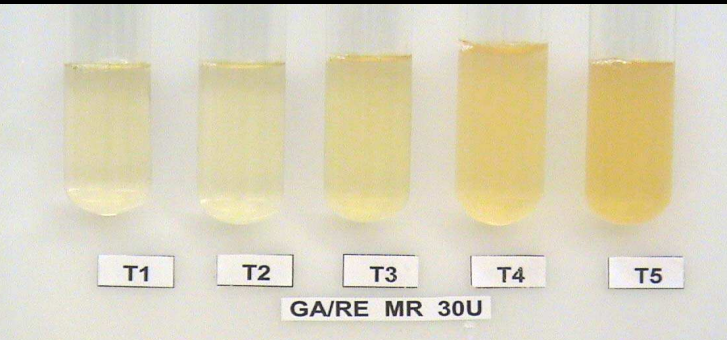
**Tabela 8.1.** Liberação de timol das micropartículas coacervadas da emulsão gelatina/oleoresina de páprica-óleo de soja, em solução aquosa de SDS 1%.

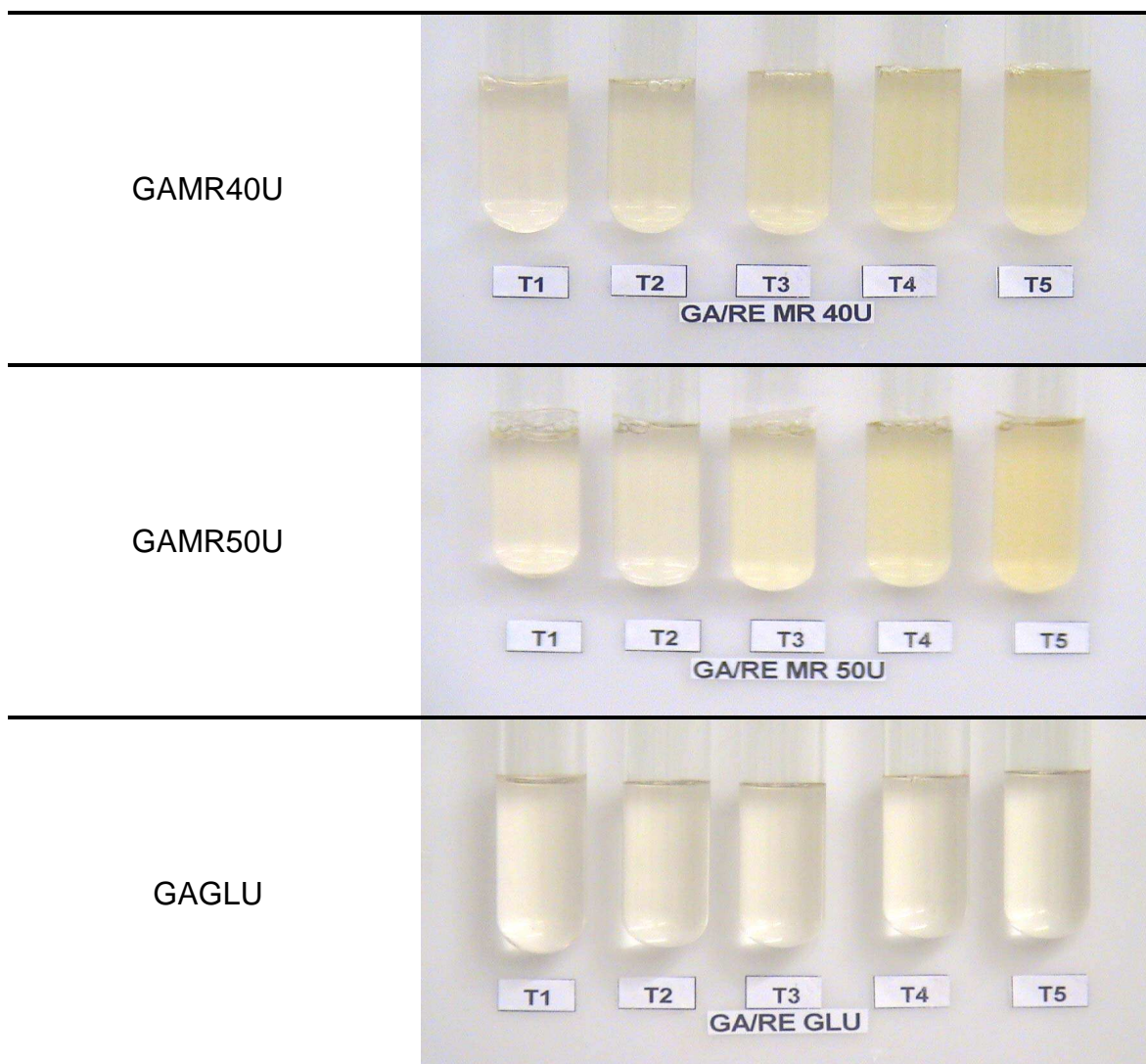
Tratamento	Liberação de timol (µg/mL)		
	30 minutos	120 minutos	240 minutos
GEMSR	183,14±8,49	177,05±7,58	169,33±2,51
GEMR10U	81,05±2,60	110,11±1,61	104,63±5,05
GEMR20U	96,17±6,50	101,30±2,09	99,19±4,31
GEMR30U	99,28±19,75	109,98±3,09	100,72±7,11
GEMR40U	149,58±5,24	151,69±5,10	144,40±2,98
GEMR50U	145,65±8,61	139,15±4,05	135,14±2,23
GEGLU	149,63±7,06	134,06±2,21	130,62±0,79

**Tabela 8.2.** Liberação de timol das micropartículas coacervadas da emulsão goma arábica/oleoresina de páprica-óleo de soja, em solução aquosa de SDS 1%.

Tratamento	Liberação de timol (µg/mL)		
	30 minutos	120 minutos	240 minutos
GAMSR	136,69±2,30	125,90±2,26	121,70±5,11
GAMR10U	123,90±5,81	130,20±3,75	123,56±0,04
GAMR20U	104,40±25,48	100,94±9,99	118,12±3,59
GAMR30U	124,14±0,95	122,34±1,73	116,44±0,70
GAMR40U	108,50±3,20	107,31±5,54	116,85±3,10
GAMR50U	105,52±4,25	107,31±4,05	135,14±2,23
GAGLU	121,46±2,33	114,80±11,94	109,33±3,66

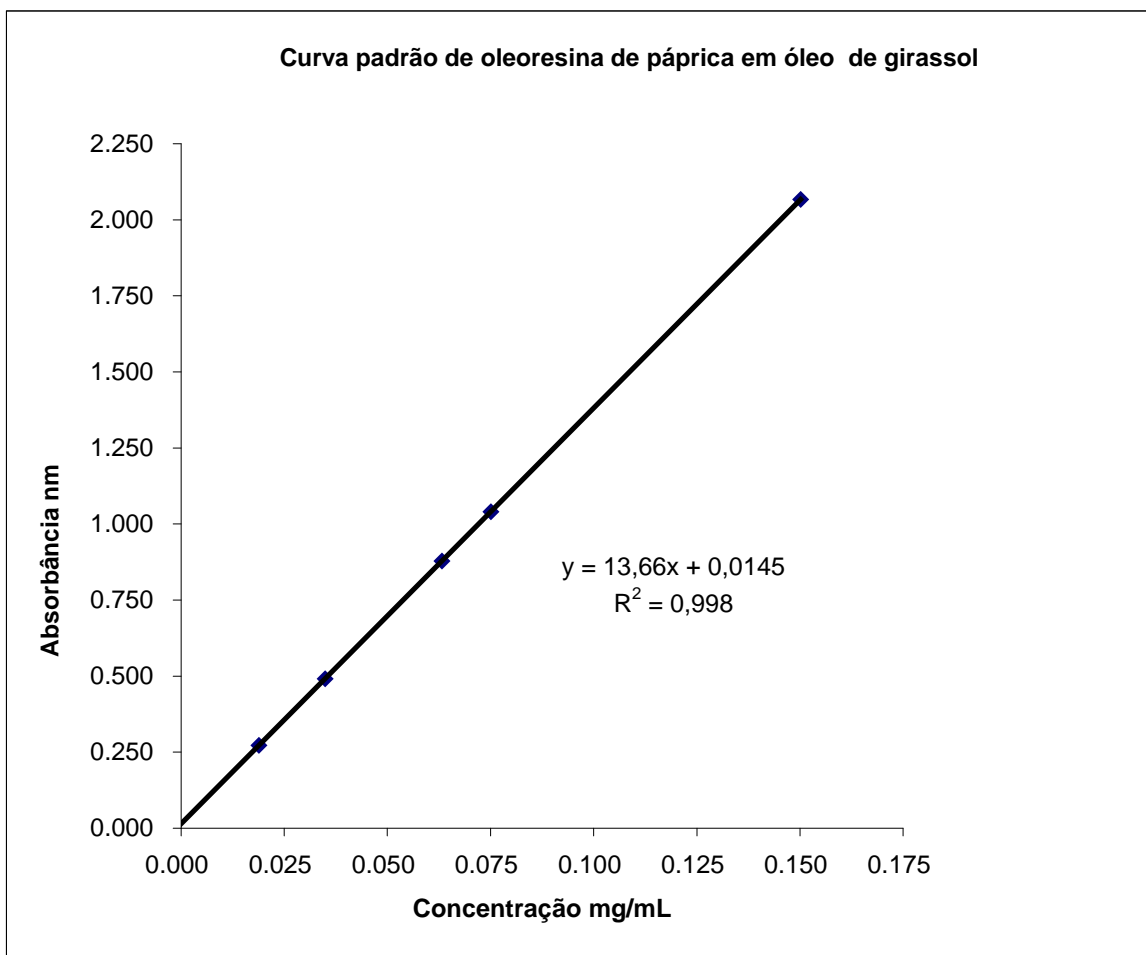
**8.2 Anexo 2** – Fotos da liberação de timol das micropartículas coacervadas da emulsão goma arábica/oleoresina de páprica-óleo de soja, em solução aquosa de SDS 1%.

Tratamento	
GAMSR	
GAMR10U	
GAMR20U	
GAMR30U	



**Figura 8.1.** Fotos da liberação de timol das micropartículas coacervadas da emulsão goma arábica/oleoresina de páprica-óleo de soja, em solução aquosa de SDS 1% (T1=30 min; T2=60 min; T3=120 min; T4=180 min; T5=240 min).

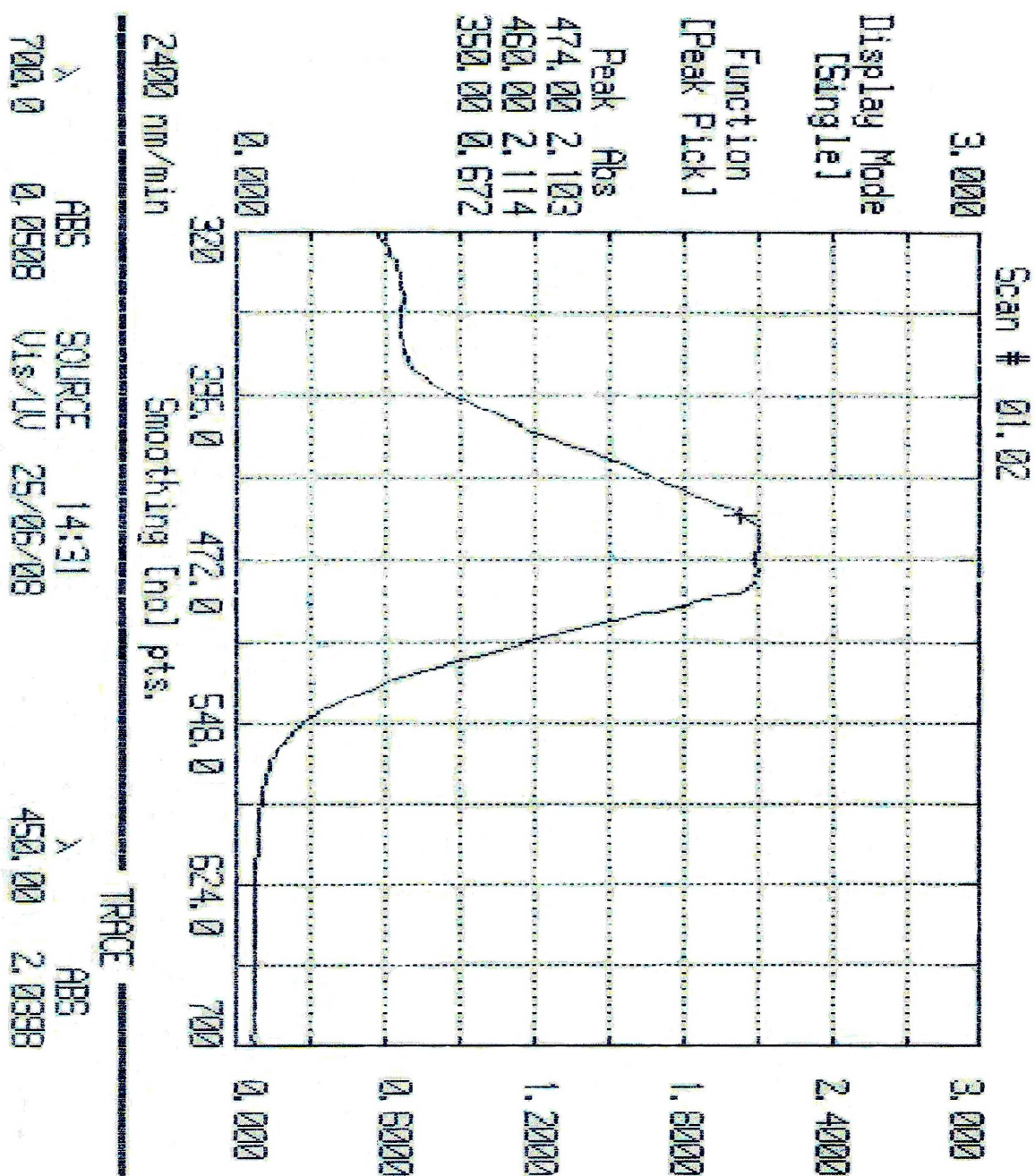
### 8.3 Anexo 3 – Curva padrão de oleoresina de páprica em óleo de girassol



**Figura 8.2.** Curva padrão de oleoresina de páprica, em óleo de girassol.

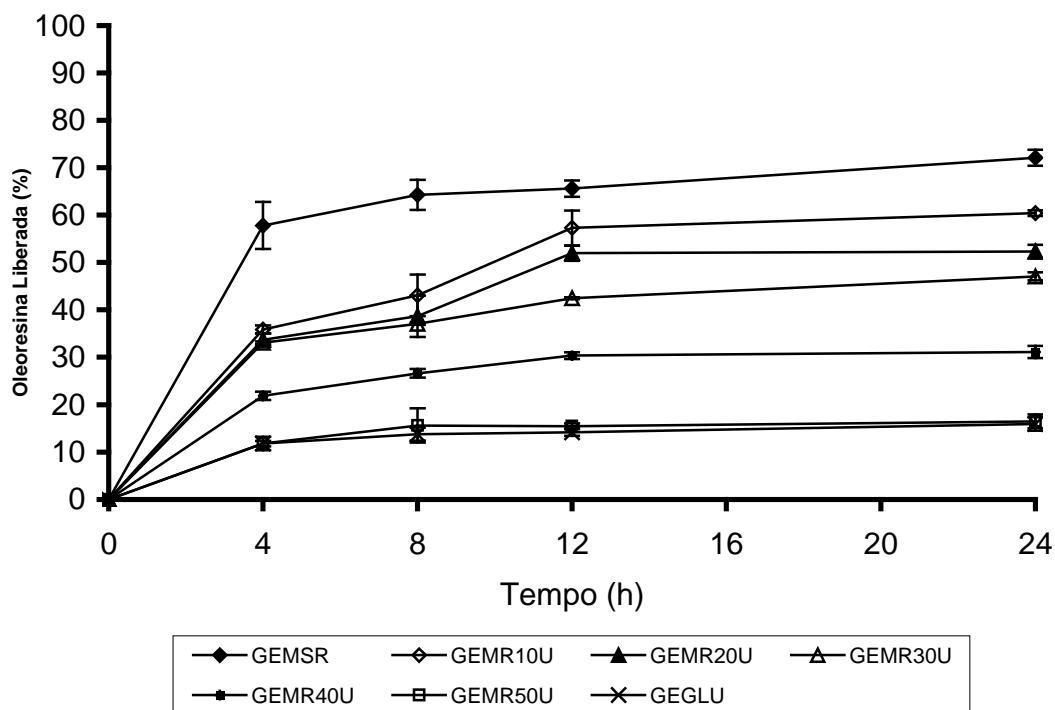


- 8.4 **Anexo 4** - Espectro de varredura da oleoresina de páprica solubilizada em óleo de girassol (concentração de 0,15mg de oleoresina de páprica/mL de óleo de girassol).



**8.5 Anexo 5 – Perfis de liberação de oleoresina de páprica contida em micropartículas coacervadas da emulsão gelatina/oleoresina de páprica-óleo de soja, em óleo de girassol.**

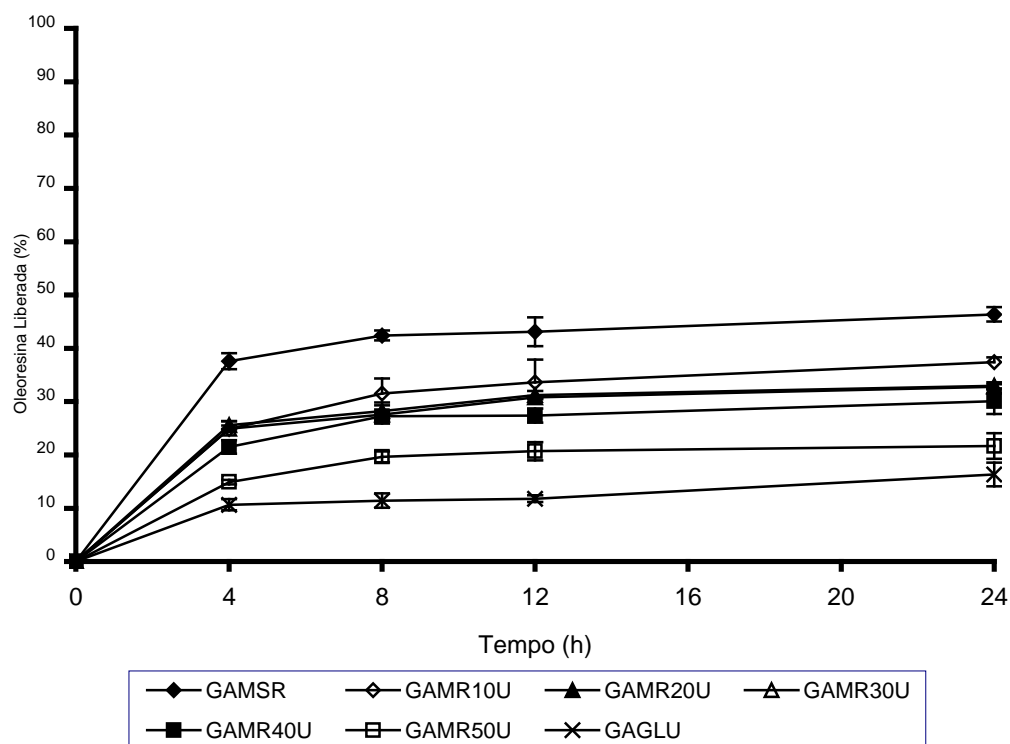
Liberação de oleoresina de páprica em óleo de girassol



**Figura 8.3.** Perfis de liberação de oleoresina de páprica contida em micropartículas coacervadas da emulsão gelatina/oleoresina de páprica-óleo de soja, em óleo de girassol.

**8.6 Anexo 6 – Perfis de liberação de oleoresina de páprica contida em micropartículas coacervadas da emulsão goma arábica/oleoresina de páprica-óleo de soja, em óleo de girassol.**

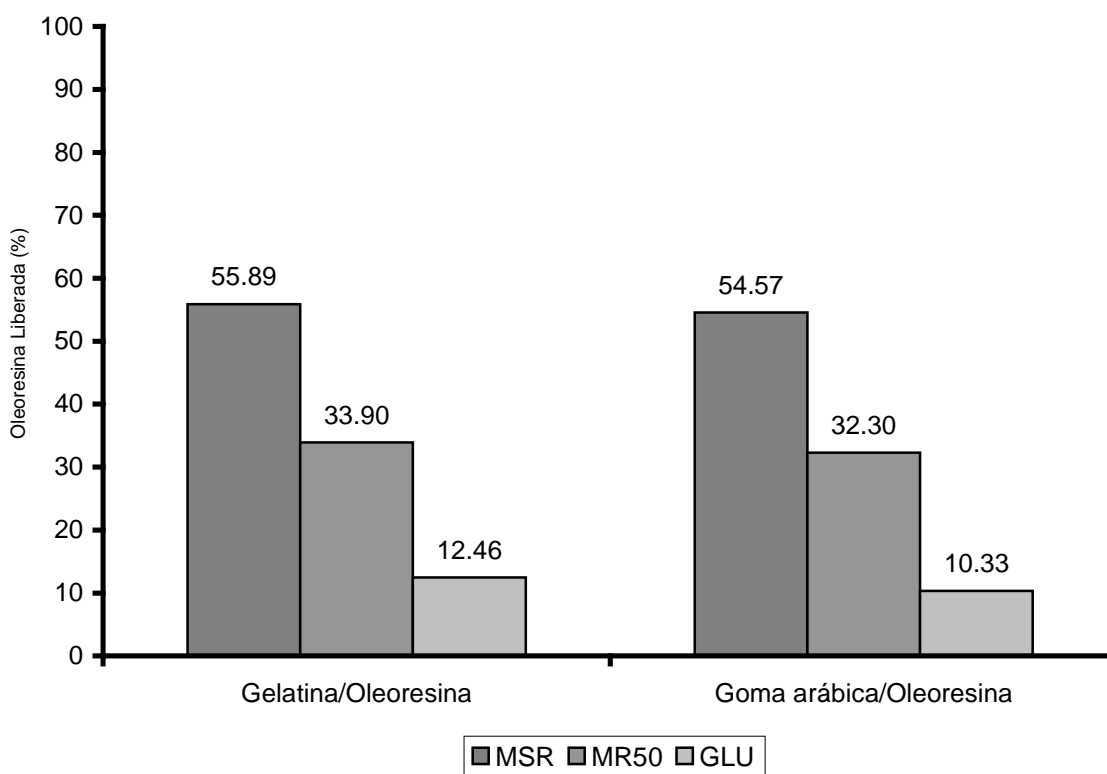
Liberação de oleoresina de páprica em óleo de girassol



**Figura 8.4.** Perfis de liberação de oleoresina de páprica contida em micropartículas coacervadas da emulsão goma arábica/oleoresina de páprica-óleo de soja, em óleo de girassol.

**8.7 Anexo 7 –** Porcentagem de liberação de oleoresina de páprica contida nas micropartículas coacervadas em condições gástricas, em óleo de girassol.

Efeito da reticulação das micropartículas em condições gástricas na liberação da oleoresina de páprica (pH=1.2, pepsina, 2 horas, 37°C)



**Figura 8.5.** Porcentagem de liberação de oleoresina de páprica contida nas micropartículas coacervadas em condições gástricas, em óleo de girassol.